

# **Lymfocytoosi koiran keuhkohuuhtelunäytteessä**

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

ELK Hanna Rissanen

Pieneläinten sisätautioppi

Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Helsingin yliopisto

2018

Tiedekunta - Fakultet - Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning - Department Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare - Author Hanna Rissanen			
Työn nimi - Arbetets titel - Title Lymfositosi koiran keuhkokuuhtelunäytteessä			
Oppiaine - Läroämne - Subject Pieneläinten sisätautioppi			
Työn laji - Arbetets art - Level Lisensiaatin tutkielma	Aika - Datum - Month and year 4 / 2018	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 50	
<p>Tiivistelmä - Referat - Abstract</p> <p>Keuhkokuuhtelua (bronchoalveolar lavage; BAL) käytetään alempien hengitysteiden, alveolien ja interstitiumin sairauksien diagnosointiin ja sairaustilojen arviointiin. Tyypillisimmin näytteestä tutkitaan solukuva ja bakteeriviljely. Lymfosyytit ovat valkosoluja, joiden tehtävät liittyvät elimistölle vieraan materiaalin tunnistamiseen ja tuhoamiseen. Lymfosyytit ovat mukana suojaamassa elimistöä mm. erilaisilta taudinaiheuttajilta ja kasvainsoluilta.</p> <p>Tutkielman tutkimusosion tavoitteena oli kuvailla kliiniset löydökset koirilla, joilla oli todettu lymfositosi eli lymfosyyttien suurentunut osuus keuhkokuuhtelunäytteessä, ja selvittää, minkälaisiin hengitystiesairauksiin keuhkokuuhtelunäytteen lymfositosi voi liittyä. Lisäksi pyrkimyksenä oli ottaa selvää, korreloiko keuhkokuuhtelunäytteen lymfosyyttien suhteellinen lukumäärä iän, painon, sukupuolen, oireiden tyypin ja keston, veri- ja ulostenäytetulosten, muiden keuhkokuuhtelunäytteen tulosten sekä rintaontelon röntgenkuvien löydösten kanssa.</p> <p>Tutkimusosion aineistoon on valikoitu Yliopistollisen eläinsairaalan koirapotilaat, joilta otettiin keuhkokuuhtelunäyte aikavälillä 9/2011 – 6/2017, ja joiden soluerittelyn tuloksissa lymfosyyttien suhteellinen osuus oli 16,0 % tai suurempi. Koirien potilastiedoista taulukoitiin jokaisen yksilön rotu, sukupuoli, ikä, paino, kliiniset oireet ja niiden kesto, verinäytetulokset (hematologia ja verikaasut), ulostenäytteiden (flotaatio- ja Baermann-menetelmät sekä <i>Giardia</i>-tutkimus) tulokset, rintaontelon röntgenkuvalöydökset sekä keuhkokuuhtelunäytteen solukuva löydökset. Koirat ryhmiteltiin oireiden syyn perusteella viiteen ryhmään (ryhmä 1: krooninen bronkiitti, ryhmä 2: hengitystieoireet ilman tähtystyslöydöksiä, ryhmä 3: ylähengitysteiden sairaus, ryhmä 4: aiempi infektio ja ryhmä 5: aiempi eosinofiilinen bronkopneumopatia (EBP)). Jos potilaan oireiden taustalla oli jokin muu kuin hengitystiesairaus, tai jos potilastiedot olivat puutteellisia, koira jätettiin tutkimuksen ulkopuolelle. Lopullisessa aineistossa on mukana 64 koiraa. Tilastollinen analyysi tehtiin IBM SPSS Statistics 24 -ohjelmaa käyttäen. Taulukoitujen lukuarvojen väliset korrelaatiot laskettiin. Tilastollisen merkitsevyyden rajana pidettiin p-arvoa &lt; 0,05.</p> <p>Keuhkokuuhtelunäytteen lymfositosi voi tutkimuksessa tehdyn koirien ryhmittelyn perusteella liittyä erilaisiin sairauksiin, eikä aina kyseessä ei ole selkeä alempien hengitysteiden sairaus. Tutkimuksen koirien iässä ja painossa esiintyi hajontaa. Koirat edustivat molempia sukupuolia sekä 32 eri rotua. Yleisimmät oireet koirilla olivat yskä, muutokset hengityksessä, apatia, heikentynyt rasituksensietokyky sekä ruokahalun huonontuminen. Oireiden kesto oli tyypillisesti useita kuukausia. Ulostenäytteiden tai keuhkojen röntgenkuvien löydöksissä ei havaittu selkeitä koko aineiston koiria yhdistäviä tekijöitä. Keuhkokuuhtelunäytteen lymfosyyttien suhteellisella osuudella havaittiin tilastollisesti merkitsevä negatiivinen korrelaatio ainoastaan keuhkokuuhtelunäytteen makrofagien kanssa.</p> <p>On oletettavaa, että lymfositosin etiologia keuhkokuuhtelunäytteessä on monitekijäinen, ja lymfositosin aiheutumisen mekanismit ovat eri sairauksissa erilaiset. Toistaiseksi ei tiedetä, minkä tyyppiset lymfosyytit ovat vallalla kunkin hengitystiesairausten yhteydessä, ja minkälaisia histopatologisia muutoksia keuhkokudoksista löytyy koirilla, joiden keuhkokuuhtelunäytteissä havaitaan lymfositosi. Lisää tutkimustietoa aiheesta tarvitaan.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords Lymfositosi, keuhkokuuhtelu, BAL, bronchoalveolar lavage, koira			
Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited  HELDA – Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktör och ledare - Director and Supervisor(s)  Työn johtaja: pieneläinsisätautiopin dosentti, ELT, pieneläinsairauksien erikoiseläinlääkäri Minna Rajamäki Työn ohjaaja: ELT, pieneläinsairauksien erikoiseläinlääkäri Sanna Viitanen			

# SISÄLLYS

<b>1 JOHDANTO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 KIRJALLISUUSKATSAUS .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Keuhkohuuhtelu .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Määritelmä ja taustaa.....	2
2.1.2 Indikaatioita .....	3
2.1.3 Näytteenottotekniikka.....	5
2.1.4 Tutkimuksen haittavaikutukset ja vasta-aiheet .....	10
2.1.5 Näytteen tutkiminen .....	12
2.1.6 Sytologia .....	14
2.1.7 Bakteeriviljely .....	17
<b>2.2 Lymfosyytit.....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Määritelmä.....	19
2.2.2 Jaottelu .....	20
2.2.3 Tuotanto ja kypsyminen .....	20
2.2.4 Toiminta ja tehtävät.....	21
<b>2.3 Lymfocytoosi koiran keuhkohuuhtelunäytteessä eri keuhkosairauksissa .....</b>	<b>23</b>
<b>3 TUTKIMUS .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Aineisto ja menetelmät .....</b>	<b>26</b>
3.1.1 Eläimet.....	26
3.1.2 Tilastollinen käsittely.....	27
<b>3.2 Tulokset.....</b>	<b>28</b>
3.2.1 Aineiston ryhmittely ja ryhmien perustiedot.....	28
3.2.2 Oireiden kuvailu .....	29
3.2.3 Hematologia .....	31
3.2.4 Verikaasut.....	32
3.2.5 Ulostenäytteet .....	33
3.2.6 Rintaontelon röntgenkuvien löydökset .....	34
3.2.7 Keuhkohuuhtelunäytteet.....	35
3.2.8 Korrelaatiot .....	36
<b>4 POHDINTA .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Aineiston ryhmittely .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 Ryhmien perustiedot .....</b>	<b>38</b>
<b>4.3 Oireet ja niiden kesto .....</b>	<b>39</b>
<b>4.4. Veri- ja ulostenäytteiden sekä rintaontelon röntgenkuvien löydökset .....</b>	<b>40</b>
<b>4.5 Korrelaatiot.....</b>	<b>42</b>
<b>4.6 Tutkimuksen haasteet.....</b>	<b>42</b>
<b>4.7 Tulokset ja tulevaisuus.....</b>	<b>43</b>
<b>5 LÄHTEET .....</b>	<b>45</b>
<b>LIITE 1 .....</b>	<b>51</b>

# 1 JOHDANTO

Keuhkohuuhtelu (bronkoalveolaarihuuhtelu; bronchoalveolar lavage; BAL) on diagnostinen menetelmä, jota käytetään koirilla alempien hengitysteiden sairauksien diagnostiikassa ja seurannassa (Hawkins 2004, De Lorenzi ym. 2009). Tyypillisimmin näytteestä tutkitaan sytologia eli solukuva ja bakteeriviljely (Hawkins 2004).

Lymfosyytit eli imusolut ovat valkosoluja. Niiden tehtävät liittyvät elimistölle vieraan materiaalin tunnistamiseen ja tuhoamiseen. Lymfosyytit ovat mukana suojaamassa elimistöä mm. erilaisilta taudinaiheuttajilta ja kasvainsoluilta (Delves ym. 2006, Salmi & Meri 2011).

Lymfocytoosin eli lymfosyyttien suurentuneen määrän merkityksestä koirien keuhkohuuhtelunäytteissä löytyy tietoa kirjallisuudesta vain vähän. Tämän tutkimuksen tavoitteena on kuvailla kliiniset löydökset koirilla, joilla oli todettu lymfocytoosi keuhkohuuhtelunäytteessä, ja selvittää, minkälaisiin hengitystiesairauksiin keuhkohuuhtelunäytteen lymfocytoosi voi liittyä. Tavoitteena on myös ottaa selvää, korreloiko lymfosyyttien suhteellinen lukumäärä koiran keuhkohuuhtelunäytteessä koiran iän, painon, sukupuolen, oireiden tyypin ja keston, veri- ja ulostenäytetulosten, muiden keuhkohuuhtelunäytteen tulosten sekä rintaontelon röntgenlöydösten kanssa.

Tutkimuksen hypoteesina on, että keuhkohuuhtelunäytteen lymfocytoosi voi liittyä useisiin eri hengitystiesairauksiin, ja yhteys lymfocytoosin ja jonkin tai joidenkin edellä mainittujen tekijöiden välille voidaan löytää.

## **2 KIRJALLISUUSKATSAUS**

### **2.1 Keuhkohuuhtelu**

#### **2.1.1 Määritelmä ja taustaa**

Keuhkohuuhtelua käytetään lääketieteessä sekä ihmisillä että eläimillä alempien hengitysteiden, alveolien ja interstitiumin sairauksien diagnosointiin ja sairaustilojen arviointiin (Hawkins 2004, De Lorenzi ym. 2009). Näyte otetaan tyypillisimmin silloin, kun eläimellä on alahengitysteiden sairauteen viittaavia oireita tai keuhkojen röntgenkuvissa on todettu muutoksia (Andreasen 2003, Hawkins 2004). Muutoksia voivat aiheuttaa mm. bakteeri-, virus-, sieni-, mykoplasma- ja alkueläininfektiot, kasvainsairaudet, eosinofiilinen bronkopneumopatia (EBP), ödeema ja verenvuodot (Andreasen 2003). Keuhkohuuhtelunäytteitä on tutkittu eläimiltä ja ihmisiltä jo kymmenien vuosien ajan (Hawkins 2004).

Keuhkohuuhtelunäyte otetaan yleensä bronkoskopian eli keuhkoputkien tähytyksen yhteydessä (Hawkins ym. 1995, Hawkins 2004). Näytteenoton tarkoituksena on kerätä keuhkojen epiteeliä vuoraavaa nestettä (ELF, epithelial lining fluid) ruiskuttamalla steriiliä keittosuolaliuosta keuhkoputkiin (Rennard ym. 1986, Hawkins ym. 1995). Keittosuolaliuos huuhtelee ilmateitä ja alveoleja, jolloin nesteen mukaan tarttuu soluja. Neste imetään ruiskun avulla takaisin, jolloin saadaan keuhkohuuhtelunestenäyte (BALF, bronchoalveolar lavage fluid), joka koostuu huuhtelunesteestä ja ELF:stä (Hawkins ym. 1995). Näytteenottotekniikkaa on käsitelty tarkemmin luvussa 2.1.3.

Keuhkohuuhtelunäytteen rutiinianalyysiin eläimillä kuuluvat sytologia eli solukuva ja bakteeriviljely (Hawkins 2004). Näistä kerrotaan tarkemmin luvuissa 2.1.6 ja 2.1.7. Toisinaan tehdään myös mm. sieni- ja mykoplasma-tiljelyjä (Hawkins 2004). Ihmisillä keuhkohuuhtelunäytteitä käytetään paljon hengitystieinfektioiden diagnostiikassa, erityisesti immunosuppressiivisista sairauksista kärsivillä

potilaille (Tukiainen 1997). Näytteistä on mahdollista tehdä edellä mainittujen analyysien lisäksi mm. virusviljelyjä, antigeenitestejä, PCR-tutkimuksia sekä kasvainsolujen monoklonaalisia markkeritestejä (Hawkins 2004). Myös aikaisempaa asbestialtistusta voidaan arvioida keuhkohuuhtelunäytteestä (Tukiainen 1997).

Keuhkohuuhtelunäytteitä on hyödynnetty klinisen työn lisäksi myös monenlaisissa tutkimuksissa sekä ihmisillä että eläimillä. Näytteiden avulla on voitu mm. tutkia alempien hengitysteiden paikallista immuunivastetta, solujen vaurioita erilaisissa sairaustiloissa sekä erilaisten lääkkeiden paikallisia vaikutuksia kudoksissa (Hawkins 2004).

On huomioitava, että keuhkohuuhtelu on eri asia kuin henkitorven tai keuhkoputkien huuhtelu, joita käytetään ylempien hengitysteiden tutkimiseen. Näissä näyttemateriaalia saadaan vain ylempien hengitysteiden pinnoilta, kun taas keuhkohuuhtelussa näyttemateriaali saadaan pääosin pienistä keuhkoputkista ja alveolitasolta (Hawkins 2004, Syring 2004).

### **2.1.2 Indikaatioita**

Keuhkohuuhtelu sopii tutkimusmenetelmäksi keuhkosairaille potilaille, joilla ongelma paikallistuu alempiin ilmatiehyisiin, alveoleihin tai interstitiumiin (Hawkins 2004, De Lorenzi ym. 2009). Menetelmä ei kuitenkaan sovi käytettäväksi vakavista hengitysvaikeuksista kärsiville potilaille, joille anestesia voi aiheuttaa huomattavan riskin. Huuhtelu suositellaan tehtäväksi rutiininomaisesti bronkoskopian yhteydessä, sillä huuhtelunäyte antaa usein tärkeää lisäinformaatiota bronkoskopiatutkimukseen (Hawkins 2004).

Keuhkohuuhtelunäytteen luotettavuudesta sairauden diagnostiikassa on osin eriäviä mielipiteitä. Andreasen (2003) pitää keuhkohuuhtelua epäluotettavana menetelmänä tilanteissa, joissa leesioita keuhkoissa on vähän, ja ne ovat paikallisia. Epäluotettavuus perustellaan sillä, että yksittäisen leesion lähelle voi joissain tilanteissa olla haasteellista päästä endoskoopinkaan avulla, ja siksi huuhtelu ei välttämättä onnistu tarkoitetulta alueelta ihanteellisesti (Andreasen

2003). Hawkins (2004) taas pitää keuhkohuuhtelua hyvänä tutkimusmenetelmänä alempien hengitysteiden sairauksien diagnostiikassa tutkittaessa sekä diffuuseja että paikallisia muutoksia, ja menetelmä on yleisesti käytössä monentyyppisten alahengitysteiden muutosten tutkimisessa (Hawkins 2004).

Toimenpiteeseen liittyvät riskit bronkoskopian ja anestesian aiheuttamiin riskeihin lisättyä ovat erittäin vähäisiä (Andreasen 2003, Hawkins 2004). Keuhkohuuhtelunäytteitä voidaan ottaa tarkennetusti tietystä keuhkojen osasta esim. rintaontelon röntgenkuvissa havaittujen löydösten perusteella. Huuhtelu on mahdollista tehdä myös ilman bronkoskopiaa. Tämä voi tulla kyseeseen esim. silloin, jos potilaalla on diffuusi keuhkosairaus, eikä bronkoskopiaan löydy välineistöä tai osaamista, tai jos eläimen omistaja haluaa säästää tutkimuskustannuksissa. Ilman bronkoskopiaa tehtyä tutkimusta kutsutaan nimellä NB-BAL (non-bronchoscopic bronchoalveolar lavage) (Hawkins 2004).

Ihmispuolella lääketieteessä keuhkohuuhtelua käytetään keuhkosairauksien diagnostiikan lisäksi hoitomuotona alveolaariseen proteinoosiin. Se on harvinainen tila, jossa surfaktanttia ja solujen hajoamistuotteita kertyy alveoleihin häiritsemään normaalia ventilaatiota (Taskinen 1997, Hawkins 2004). Eläimillä kyseinen sairaus on erittäin harvinainen. Toistaiseksi eläinlääketieteessä keuhkohuuhtelua käytetäänkin vain alahengitysteiden sairauksien diagnostiikassa (Hawkins 2004).

Keuhkohuuhtelussa on vähäisemmät riskit ja kustannukset verrattuna keuhkobiopsiaan (Hawkins 2004). Keuhkokudoksen biopsianäytteestä tehty histopatologinen tutkimus auttaa usein pääsemään luotettavimpaan diagnoosiin, mutta näytteitä otetaan eläviltä potilailta melko harvoin niiden kustannusten ja näytteenoton vaatiman invasiivisen kirurgian takia (Griffin 2004, Heikkilä-Laurila & Rajamäki 2014). Hawkinsin ym. (1995) tekemässä tutkimuksessa keuhkohuuhtelunäytteestä tehtyjen sytologisten tutkimusten avulla päästiin 68 koiran tutkimusaineistossa lopulliseen diagnoosiin 17 koiran kohdalla eli 25 %:ssa tapauksista. 50 %:ssa tapauksista (34 koiran kohdalla 68:sta) keuhkohuuhtelunäytteistä tehdyt sytologiset tutkimukset tukivat jo saatua

diagnoosia. 17 koiran kohdalla eli 25 %:ssa tapauksista keuhkohuuhtelunäytteen ottamisesta ei ollut apua diagnoosiin pääsemisessä. Tutkimuksessa tarkka diagnoosi oli määritelty mahdolliseksi vain, jos sytologisissa tutkimuksissa havaittiin kasvainsoluja ja niissä selvät viitteet pahanlaatuisuuteen ilman viitteitä tulehdusmuutoksista, tai jos nähtiin solunsisäisiä bakteereita tai solunulkopuolisia taudinaiheuttajia. Todellisuudessa näitä epätarkemmistakin löydöksistä voi olla hyötyä diagnoosiin pääsemisessä, ja tällä perusteella kliinisessä käytössä keuhkohuuhtelunäytteestä tehtävistä sytologisista tutkimuksista voisi olla apua diagnoosiin pääsemisessä useammin (Hawkins ym. 1995).

Keuhkohuuhtelunäytteen hyödyntäminen diagnostiikassa perustuu aina positiivisiin löydöksiin: taudinaiheuttajien tai kasvainsolujen löytyminen näytteestä voi johtaa diagnoosiin, mutta toisaalta niiden puuttuminen ei automaattisesti sulje sairautta pois (Hawkins 2004).

### **2.1.3 Näytteenottotekniikka**

Keuhkohuuhtelunäyte on hyvä ottaa aina mahdollisimman samalla tavalla, jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia keskenään (Hawkins 2004). Näyte otetaan yleisanestesiassa, jotta potilas ei yskisi tai saisi laryngospasmia eli kurkunpään kouristusta toimenpiteen aikana. Riittävän syvässä anestesiassa olevalta potilaalta on myös helpompi ottaa näyte vaurioittamatta hengitysteitä, ja vastaavasti hyvin nukkuva potilas ei vastustele tutkimusta ja siten pääse vaurioittamaan endoskooppia (Johnson 2010).

Anestesiaprotokolla tulee suunnitella huolellisesti ja potilaskohtaisesti. Verenkierto- ja hengityselimistön laman mahdollisuus on hyvä huomioida ennakkoon, ja käytettävät lääkeaineet ja -annokset tulee valita riskit minimoiden (Johnson 2010). Yleisanestesiassa olevalta koiralta tulisi monitoroida toimenpiteen aikana ainakin hengitystä, sykettä ja limakalvojen väriä. Suositeltavaa olisi myös EKG-käyrän, happisaturaation sekä valtimoverenpaineen seuranta toimenpiteen aikana. Ennen varsinaista toimenpidettä suositellaan esihapetusta, jonka ajalliseen kestoon vaikuttaa potilaan yleisvointi. Mikäli mahdollista, potilaan olisi hyvä olla toimenpiteessä intuboituna (Hawkins 2004).



Usein koira asetetaan tutkimusta varten makuuasentoon rintansa päälle. Suu voidaan pitää auki suunavaajien avulla (Johnson 2010).

Yleisanestesia mahdollistaa koiran kurkunpään silmämääräisen tutkimisen. Kun kurkunpää on tutkittu, endoskooppi työnnetään varovasti henkitorveen, ja sen avulla limakalvot sekä henkitorvi ja pääkeuhkoputket tutkitaan epänormaalien löydösten varalta (Rajamäki ym. 2001, Johnson 2010). Normaalit hengitystiet ovat pyöreät tai ovaalinmuotoiset. Muoto ja halkaisija vaihtelevat hieman hengitysvaiheen mukaan. Terveiden hengitysteiden väri on vaaleanpunainen, ja eritteitä on seinämissä vain vähän (Johnson 2010).

Bronkioskopiassa mahdollisesti löydettyjen muutosten perusteella voidaan valita, mistä keuhkolohkoista huuhtelunäyte halutaan ottaa, ellei valintaa olla tehty jo aiemmin suoritettujen tutkimusten perusteella (Andreasen 2003, Hawkins 2004). Huuhtelunesteliuos ilmatiehyissä haittaa näkyvyyttä bronkioskopiassa, joten siitäkin syystä huuhtelunäyte kannattaa ottaa vasta huolellisen bronkoskopian jälkeen (Hawkins 2004). Koirilla näyte kerätään useimmiten niistä keuhkolohkoista, joissa on todettu röntgen- tai tähystysmuutoksia (Rha & Mahony 1999, Peeters 2000, Andreasen 2003). Jos muutoksia on diffuusisti koko keuhkojen alueella, näyte voidaan kerätä mistä tahansa lohkoista (Hawkins 2004). Johnson (2010) suosii tällöin oikeaa keskilohkoa tai vasemman kraniaalilohkon kaudaaliosaa. Nämä lohkot sijaitsevat ventraalisesti, kun koira makaa rintansa päällä, jolloin myös mahdolliset eritteet kerääntyvät niihin helposti (Johnson 2010). Usein diagnoosiin pääsy helpottuu, jos potilaalta otetaan huuhtelunäyte useammasta kuin yhdestä keuhkolohkosta (Hawkins 2004).

Steriloidun endoskoopin kärki kiilataan keuhkolohkoon, josta näyte halutaan ottaa (Rha & Mahony 1999, Hawkins 2004). Esim. Hawkins (2004) käyttää yleensä tähän pediatriasta endoskooppia, jonka ulkohalkaisija on 4,8 mm. Endoskoopin on hyvä olla joustava, jotta sillä päästään helposti haluttuun keuhkolohkoon (Hawkins 2004). Kun endoskooppi on saatu vietyä haluttuun kohteeseen, se kiilataan tiiviisti ilmatiehyeen (Baughman & Rennard 1999, Rha & Mahony 1999, Hawkins 2004). Mikäli endoskooppi ei ole kiilautuneena tiiviisti, takaisinimetyn nesteen

määrä on vähäisempi (Rha & Mahony 1999), ja kontaminaatio ylemmistä hengitysteistä on todennäköisempi (Baughman & Rennard 1999, Johnson 2010) kuin silloin, kun endoskooppi on kiilautuneena tiiviisti ilmatiehyeen.

Esilämmitettyä, steriiliä keittosuolaliuosta (0,9 % NaCl) ruiskutetaan endoskoopin biopsiakanavan läpi (Rha & Mahony 1999, Hawkins 2004, Johnson 2010, Woods ym. 2014). Keittosuolaliuos huuhtelee ilmatiehyitä ja alveoleja, jolloin nesteeseen tarttuu mukaan soluja. Neste imetään välittömästi saman ruiskun avulla takaisin, jolloin saadaan näyte paikallisesta solukuvasta (Hawkins ym. 1995, Hawkins 2004, Johnson 2010). Onnistuneen imun ja näytteenosaamisen jälkeen toimenpide toistetaan vielä kerran tai pari samassa keuhkolohkossa, minkä jälkeen siirrytään tarvittaessa seuraavaan keuhkolohkoon ottamaan näytteitä (Hawkins 2004).

Jos näytettä imiessä ruiskussa tuntuu alipainetta, tulee imua vähentää, jotta hengitystiet eivät painu kokoon (Rha & Mahony 1999, Hawkins 2004). Riski tähän on merkittävä lähinnä sellaisilla koirilla, jotka kärsivät kroonisesta bronkiitista eli pitkittyneestä keuhkoputkien tulehduksesta. Mikäli imun vähentämisen jälkeen edelleen esiintyy alipainetta, endoskooppia vedetään pari millimetriä takaisinpäin sen tulosuuntaan. Jos endoskooppia vedetään liikaa taaksepäin, se ei enää istu ilmatiehyisiin tiiviisti, ja tuloksena saatetaan saada ruiskuun näytteen sijaan ilmaa (Hawkins 2004). Imuun voidaan käyttää tavallisen ruiskun sijaan myös imupumppua, mutta Hawkinsin (2004) mukaan imutehon hallitseminen sen avulla on haastavampaa, ja näytteen solut vaurioituvat helpommin. Kun näytteet on saatu otettua, endoskooppi vedetään varovasti ulos hengitysteistä ja puhdistetaan keittosuolaliuokseen kastetuilla taitoksilla. Endoskoopin biopsiakanava huuhdellaan steriilillä keittosuolaliuoksella (Johnson 2010).

Näytteen käsittelyohjeet vaihtelevat kirjallisuudessa jonkin verran. Rajamäen ym. tutkimuksessa (2001) takaisin imetty neste laitettiin lasiastiaan, joka asetettiin jäihin heti näytteenoton jälkeen. Hawkins (2004) taas ohjeistaa, että näytemateriaali tulisi pitää muovisessa tai silikonilla käsitellyssä ruiskussa tai putkessa ennen siitä tehtäviä analyysejä, koska fagosyytit voivat tarttua lasin pintaan ja vääristää siten tutkimustuloksia. Viljelyyn menevä näytemateriaali tulisi

laittaa tarvittaessa sopivaan elatusaineeseen heti näytteenoton jälkeen. On huomioitava, että eroavaisuudet näytteiden käsittelyssä voivat vaikuttaa jonkin verran myös tuloksiin (Hawkins 2004).

Woodsin ym. (2014) tutkimuksessa terveiltä beagle-rotuisilta koirilta otettiin keuhkohuuhtelunäytteitä kahdella tekniikalla, manuaalisesti ruiskun avulla aspiroiden sekä ruiskuun yhdistetyn automaattisen imupumpun avulla. Imupumpun avulla otetut näytteet olivat volyymiltaan suurempia, ja myös tumallisten solujen lukumäärä näissä näytteissä oli suurempi verrattuna manuaalisesti ruiskun avulla otettuihin näytteisiin, joten kyseinen menetelmä saattaisi olla tehokkaampi näytteenotossa kuin manuaalinen menetelmä. Sytologisten näytteiden laadussa ei havaittu merkittävää eroa eri näytteenottotekniikoiden välillä (Woods ym. 2014). Woods ym. (2014) kuitenkin toteavat, että tutkimuksen otoskoko oli pieni (13 koiraa, joista yhden kohdalla tutkimus keskeytettiin), ja aiheesta tarvittaisiin lisää tutkimustietoa.

Käytettävän keittosuolaliuoksen määrää ei olla yhdenmukaistettu ihmisillä eikä eläimillä. Ihmisillä liuoksen määrä valitaan yleensä sen perusteella, että saatu näyte on tilavuudeltaan riittävä siitä tehtäviin tutkimuksiin (Hawkins 2004). Johnsonin (2010) mukaan koirilla ja kissoilla nestemäärän valintaan vaikuttavat endoskoopin halkaisijan koko, eläimen koko, näytteenottajan kokemus, kyseessä oleva sairaus ja potilaan mahdolliset hengitysvaikeudet.

Useimmiten huuhtelunesteen määrä lasketaan yksilön painon perusteella tai käytetään tietyille eläinlajeille laskettua vakiomäärää (Hawkins 2004). Tutkimuksissa huuhtelunesteen vakiomääränä koirille on käytetty 10–25 ml boluksia, jolloin yksi keuhkolohko on yleensä huuhdeltu kahta tai useampaa bolusta käyttäen (esim. 2 x 20 ml / keuhkolohko / koira) (Rha & Mahony 1999, Hawkins 2004, Dehard ym. 2008, Melamies ym. 2011, Mercier ym. 2011). Esim. Hawkins (2004) käyttää yleensä kahta 25 ml bolusta ottaessaan näytettä yhdestä keuhkolohkosta, tai pienillä (alle 8 kg painavilla) koirilla ja kissoilla jopa neljää tai viittä 10 ml bolusta yhden keuhkolohkon näytteisiin. Ensimmäisessä takaisin imetyssä boluksessa on yleensä eniten materiaalia ylemmistä hengitysteistä,

alhaisempi solujen kokonaislukumäärä sekä suhteessa enemmän neutrofiilejä ja epiteelisoluja kuin muissa boluksissa (Hawkins 2004).

Jos sopiva huuhtelunesteen määrä halutaan laskea yksilön painon mukaan, annoksena koirille käytetään useimmiten 1 ml nestettä painokilogrammaa kohden (De Lorenzi ym. 2009, Melamies ym. 2011). Melamiehen ym. (2011) tekemän tutkimuksen mukaan yksilön painon perusteella laskettua huuhtelunesteen määrää käytettäessä saadaan imettyä takaisin yhtenäisempiä määriä ELF:a kuin silloin, kun käytetään eläinlajikohtaisia vakiomääräisiä annoksia.

Onnistuneessa näytteenotossa näytettä saadaan imettyä takaisin vähintään noin 50 % ruiskutetusta tilavuudesta (Hawkins ym. 1995). Hawkinsin ym. (1995) tutkimuksessa näytteen keskimääräinen tilavuus eli imun avulla takaisin saatu tilavuus oli noin 24 ml, kun ruiskutetun nesteen tilavuus oli 50 ml (2 x 25 ml bolus), mikä on 48 % ruiskutetun nesteen tilavuudesta. Rhan & Mahonyn (1999) mukaan takaisin saadaan imettyä yleensä jopa 50–90 % ruiskutetun huuhtelunesteen tilavuudesta. Näyttemateriaaliksi saatavan nesteen päällä voidaan normaalitilanteessa havaita selkeä vaahtokerros, joka viittaa surfaktantin ja alveolaarimakrofagien läsnäoloon näytteessä (Hawkins 2004, Johnson 2010). Kiinteä materiaali näytteessä taas viittaa limaun, jota voi päätyä näytteeseen kontaminaationa keuhkoputkista (Johnson 2010).

Näytteenoton jälkeen kaikille potilaille suositellaan 5–10 minuutin ajan hapetusta 100 % hapella suoraan intubaatioputkeen. Varovainen ventilointi voi auttaa avaamaan mahdollisesti kokoon painuneita alveoleja, samoin kuin potilaan asettaminen makuuasentoon rintansa päälle. Potilaan voinnin tarkka seuranta on tärkeää lisähapen poisottamisen jälkeenkin. Jos potilaan limakalvojen väri on epänormaali tai happisaturaatio laskee, hapetusta tulee jatkaa ainakin viiden minuutin ajan. Intubaatioputki voidaan ottaa pois potilaan alkaessa herätä, ja hapetusta voidaan jatkaa esim. happimaskin avulla. Hankalassa tilanteessa tulee harkita inhalaatioanestesian jatkamista. Jos potilas ei vastaa lisähapen antamiseen, on poissuljettava keuhkoputkien äkillisen supistumisen (bronkospasmi) tai ilmarinnan mahdollisuus. Mikäli hengitysänet ovat hyvin vaimeat ja epäillään

ilmarintaa, suositellaan kokeiltavaksi terapeutista torakosenteesiä (Hawkins 2004).

Keuhkoihin näytteenoton yhteydessä jäänyt neste imeytyy elimistöön isotonisuutensa takia. On normaalia, että vielä 24 tuntia keuhkohuuhtelunäytteen ottamisen jälkeen hengitysteiden auskultaatiossa saatetaan kuulla rahinoita (crackles) (Hawkins 2004). Rintaontelon röntgenkuvissa viitteet nesteestä tai atelektasista häviävät yleensä kahden vuorokauden sisällä näytteenotosta (Hawkins 2004).

### **2.1.4 Tutkimuksen haittavaikutukset ja vasta-aiheet**

Keuhkohuuhtelu on ihmisille ja eläimille turvallinen tutkimus, jossa on havaittu hyvin vähän haittavaikutuksia (Tukiainen 1997, Hawkins 2004). Raportoituja haittavaikutuksia ihmisillä ovat ohimenevä lasku uloshengityksen sekuntikapasiteetissa ( $FEV_1$ ), hitaassa vitaalikapasiteetissa (VC), ulospuhalluksen huippuvirtauksessa (PEF) ja valtimoveren happiosapaineessa ( $PaO_2$ ). Keuhkoputkien äkillinen supistuminen eli bronkospasmi on harvinainen, elleivät potilaan hengitystiet ole hyperreaktiiviset (Hawkins 2004). Ohimeneviä kuumereaktioita esiintyy Hawkinsin (2004) mukaan 10–30 %:lla ihmispotilaista, Tukiaisen (1997) mukaan muutamalla prosentilla.

Myös eläimillä haittavaikutukset ovat vähäisiä (De Lorenzi ym. 2009). Tutkimuksissa kliiniseen käyttöön vakiintuneita huuhtelunestemääriä suuremmilla nestemäärillä huuhdeltaessa koirilla on havaittu alentunutta valtimoveren happiosapainetta ( $PaO_2$ ), lisääntynyttä hengitystiheyttä sekä kertahengitystilavuuden laskua (Hawkins 2004). Nämä ovat seurauksia alentuneesta keuhkokudoksen myötäväyydestä sekä ventilaation ja perfuusion epäsuhdasta, minkä aiheuttavat suolaliuoksen kertyminen kudoksiin ja surfaktantin menettäminen (Hawkins ym. 1995, Hawkins 2004). Yksittäisissä tutkimuksissa on havaittu yli 39,5 °C:n ruumiinlämpö muutamilla koirilla näytteenoton jälkeen, mutta lämpö on palautunut normaalirajoihin parissa vuorokaudessa. Pidempikestoista kuumeilua ei olla havaittu (Hawkins 2004).

Bronkoskopia ja anestesia saattavat voimistaa yskää tai hengitysteiden kasaan painumista erityisesti trakeakollapsista tai bronkomalasiasta kärsivillä koirilla, mutta tämä on usein ohimenevää (Johnson 2010).

Histologiset muutokset kahden vuorokauden kuluttua näytteenotosta ovat olleet minimaalisia (Hawkins 2004). Hawkinsin ym. (1995) mukaan keuhkohuuhtelunäytteenotto voidaan toistaa koiralle 48 tunnin kuluttua ilman merkittäviä muutoksia sytologiassa. Pitkäkestoisia tai kumulatiivisia haittavaikutuksia ei olla raportoitu (Hawkins 2004).

Ideaalitulanteessa näytteenottoa tulee välttää tai se tulee keskeyttää, jos eläimellä havaitaan merkittäviä hengitysvaikeuksia (Hawkins 2004). Hawkinsin ym. tutkimuksessa (1995) kaksi koiraa 101 koirasta (2 %) kuoli keuhkohuuhtelunäytteenoton yhteydessä. Molemmilla koirilla oli havaittu selkeästi vaikeutunut hengitys, ja molemmilta oli raadonavauksen yhteydessä löydetty merkkejä monisyisistä sairauksista. Samassa tutkimuksessa 47:stä lymfoomaa sairastavasta koirasta, joista 66 %:lla kasvainkudosta oli myös keuhkoissa, saatiin otettua näyte ilman komplikaatioita (Hawkins 1995).

Teoriassa on mahdollista, että näytteenoton yhteydessä aiheutetaan repeämiä kudoksiin. Jos repeämää epäillään, ruiskutettavan suolaliuoksen määrää tulee vähentää, ja potilaan vointia on seurattava tarkasti (Hawkins 2004).

Vaikka näytteenoton yhteydessä esiintyvä hypoksemia on ohimenevää ja korjaantuu yleensä lisähapen antamisella, potilaan pitää yleiskuntonsa puolesta kestää yleisanestesia ja näytteenoton aiheuttamat mahdolliset lievät hengitysvaikeudet (Hawkins 2004, Johnson 2010). Vakavista hengitysvaikeuksista ja alentuneesta keuhkojen hapenottokyvystä kärsivien potilaiden kohdalla anestesia ja näytteenotto eivät välttämättä ole turvallisia. Hoitavan eläinlääkärin tulee epäselvissä tapauksissa tehdä huolellinen ja potilaskohtainen hyöty-haitta-arvio ennen toimenpiteeseen ryhtymistä (Hawkins 2004).

## 2.1.5 Näytteen tutkiminen

Hawkins (2004) suosittelee optimaalisten tulosten saamiseksi näytteen tutkimista sytologian osalta tunnin sisällä näytteenotosta. Jos materiaalia ei heti pystytä tutkimaan, se laitetaan jääkaappiin odottamaan. Analyysi olisi tässäkin tapauksessa suositeltavaa tehdä 12 tunnin sisällä näytteenotosta (Hawkins 2004). Aiemmin näytteitä on suodatettu ennen analysointia, mutta tätä ei enää suositella, sillä suodattaminen muuttaa eri tyyppisten solujen pitoisuuksia ja keskinäisiä suhteita (Andreasen 2003).

Eri keuhkolohkoista otetut näytteet suositellaan tutkittavaksi toisistaan erillään (Hawkins 2004). Hawkinsin ym. (1995) tutkimuksessa keuhkohuuhtelunäytteen tuloksissa oli vaihtelua eri keuhkolohkojen välillä 23:lla 63:sta tutkitusta koirasta (37 %), joilla havaittiin diffuuseja muutoksia rintaontelon röntgenkuvin. Esim. sienten aiheuttama pneumonia näkyi kyseisen tutkimuksen keuhkohuuhtelunäytteiden sytologiassa vain joissakin keuhkolohkoissa kolmella kuudesta sairaasta koirasta, vaikka röntgenmuutokset havaittiin kaikilla kuudella koiralla diffuusisti koko keuhkojen alueella (Hawkins ym. 1995).

Samasta keuhkolohkosta saatuja erillisiä näyteboluksia voi myös vertailla keskenään. Ensimmäisessä boluksessa on suhteessa eniten materiaalia ylemmistä hengitysteistä (Rha & Mahony 1999, Hawkins 2004). Hawkinsin (2004) mukaan on kuitenkin epätodennäköistä, että asian vaikutus olisi kliinisesti erityisen merkittävä. Ihmispuolella osa tutkijoista on kuitenkin sitä mieltä, että ensimmäinen bolus pitäisi jättää kokonaan tutkimatta, ja vain myöhemmät bolukset ovat tulosten kannalta merkittäviä (Hawkins 2004).

Solujen (tumalliset solut) kokonaislukumäärä lasketaan hemosytometrin avulla (Hawkins 2004) tai manuaalisesti (De Lorenzi ym. 2009) laimentamattomasta näytteestä. Solujen erittelylaskentaa varten näytettä vaaditaan usein vähintään 100–200 µl yhdelle objektilasille, jotta näyte edustaisi riittävän hyvin solujen suhteellisia lukumääriä alveolitasolla. Solujen konsentraatio alkuperäisessä näytteessä on usein tähän liian matala, joten yleensä näyte sytosentrifugoidaan

ennen varsinaisten solupreparaattien valmistamista. Värjäyksiin voidaan käyttää esim. quick-Romanowsky-, Wright-Giemsa-, (Hawkins 2004) tai May-Grünwald-Giemsa -tekniikoita (De Lorenzi ym. 2009). Hawkinsin (2004) mukaan vähintään 200 solua tulisi laskea, jotta erittelylaskenta olisi luotettava. De Lorenzin ym. (2009) mukaan makrofagien, neutrofiilien ja eosinofiilien määrän arvioimista varten näytteestä tulee laskea vähintään 200 solua, ja saman tutkimuksen perusteella tulisi laskea vähintään 500 solua, jos halutaan arvioida kaikkien solujen suhteellinen osuus näytteessä (De Lorenzi ym. 2009). Näyte tulee tutkia tarkasti kasvainsolujen ja infektiivisten tekijöiden varalta. Yksittäiselläkin näytteestä löytyneellä organismilla voi olla kliinisellä tasolla suuri merkitys, erityisesti, jos kyseessä on sienen, alkueläimen tai parasiitin aiheuttama sairaus tai kasvainsairaus. (Hawkins 2004).

Ideaalitulanteessa bakteeriviljely tehdään keuhkohuuhtelunäytteestä kvantitatiivisella tai semikvantitatiivisella menetelmällä (Hawkins 2004, Creevy 2009). Jos tämä ei esim. kustannussyistä onnistu, tulee näyte laittaa heti sen ottamisen jälkeen viljelyalustalle ja/tai sopivaan elatusaineeseen. Kvalitatiiviset menetelmät ovat kliinisessä työssä yleisemmin käytössä kuin kvantitatiiviset tai semikvantitatiiviset menetelmät (Hawkins 2004).

Mykoplasmojen merkitystä keuhkohuuhtelunäytteissä ei vielä täysin tunneta. Niitä esiintyy kissoilla enemmän kuin koirilla. Mykoplasma viihtyy limakalvoilla, joten keuhkoputkien harjairtosolunäytteet (bronchial brushings) ja bronkushuuhtelunäytteet (bronchial washings) saattavat olla parempia tutkimusmenetelmiä mykoplasmojen osalta kuin keuhkohuuhtelunäytteet. On huomioitava, että mykoplasmoilla on erityisvaatimuksia käsittelyn ja viljelytekniikoiden osalta. Myös sieniviljelyt vaativat erityisvälineistöä (Hawkins 2004).



## 2.1.6 Sytologia

Keuhkohuuhtelunäytteenotto mahdollistaa ELF:n keräämisen alemmista hengitysteistä tehokkaasti, mutta laimentaa sitä merkittävästi (Rennard ym. 1986). Solujen kokonaismäärissä havaitaan suuria vaihteluja terveilläkin eläimillä (Rajamäki ym. 2001, Hawkins 2004), minkä vuoksi tarkkojen viiterajojen asettaminen solujen kokonaismäärille on haastavaa (Hawkins 2004, Creevy 2009).

Koska keuhkohuuhtelunäytteenottotoimenpidettä ja -näytteenkäsittelyä ei olla vakioitu, tuloksissa on kaiken kaikkiaan melko runsaasti vaihtelua (Rha & Mahony 1999). Hengitystiesairauden tyyppi, eläimen muut sairaudet, lääkitykset, huuhteluun kulunut aika ja käytetty paine, huuhtelunesteen ja -kertojen määrä, huuhdeltava keuhkojen alue, huuhtelun suorittajan kokemus, potilaan asento, näytteen käsittely ja säilytys voivat kaikki vaikuttaa tuloksiin (Baughman & Rennard 1999). Pieniä poikkeamia suuntaa antavista viiterajoista ei edellä mainittujen syiden takia tulisi ylitulkita (Hawkins 2004). On myös huomioitava, että keuhkohuuhtelunäytteen solukuva on erilainen kuin ylemmistä hengitysteistä (pääkeuhkoputkista tai henkitorvesta) otetuissa huuhtelunäytteissä, eivätkä tulokset siis ole vertailukelpoisia keskenään (Creevy 2009). Jos näytteessä solujen kokonaismäärä on hyvin alhainen, voi syynä olla se, että huuhtelunestettä ei ole päätenyt riittävästi alveolitasolle. Tällöin näyte on peräisin pääosin keuhkoputkista, joista saadulle näytteelle matalampi solujen kokonaismäärä on tyypillinen (Hawkins 2004, De Lorenzi ym. 2009).

Taulukossa 1 on esitelty kirjallisuudesta poimittuja terveiden koirien keuhkohuuhtelunäytetuloksia. Eri tutkimuksissa tulokset on esitetty käyttäen eri tunnuslukuja, ja siten ne eivät ole keskenään täysin vertailukelpoisia. Tuloksissa voidaan kuitenkin havaita melko runsaasti vaihtelua.

*Taulukko 1. Kirjallisuudessa esitettyjä terveiden koirien keuhkokuuhtelunäytetuloksia. Eri tutkimuksissa on käytetty osittain eri tunnuslukuja, eivätkä tulokset sen vuoksi ole keskenään täysin vertailukelpoisia. Kussakin lähteessä käytetyt tunnusluvut on ilmoitettu sarakkeiden otsikoissa. Näytteen tilavuus (%) kuvaa, kuinka suuri prosentuaalinen osuus keuhkoihin ruiskutetusta nestemäärästä saadaan imettyä takaisin. Hirtin ym. (2010) tutkimuksessa mononukleaarisolulla tarkoitetaan valkosoluja, joilla on liuskoittumaton tuma (esim. makrofagit ja lymfosyytit). Samassa tutkimuksessa LMA (laryngeal mask airway) viittaa larynx- eli kurkunpäämaskiin, ja NT (nasal catheter) happikatetriin, joiden vaikutuksia keuhkokuuhtelunäytteen tuloksiin tutkimuksessa verrattiin (Hirt ym. 2010).*

	Hawkins ym. 1990 (keskiarvo, keskihajonta, 95 % luottamusväli)	Rajamäki ym. 2001 (keskiarvo, keskihajonta, 95 % luottamusväli)	Hirt ym. 2010 LMA (keskiarvo)	Hirt ym. 2010 NT (keskiarvo)	Heikkilä ym. 2011 (mediaani, kvartaaliväli, 95 % luottamusväli)
Näytteen tilavuus (%)		63,1 ± 7,5 (59,1-67,1)			56, IQR 49-69 (40-76)
Solujen kokonaismäärä (solua/μl)	200 ± 86 (54-454)	103,9 ± 68,5 (67,4-140,5)	734	755,5	350, IQR 280-380 (265-420)
Mononukleaariset solut (%)			87,1	85,6	
Makrofagit (%)	70 ± 11 (49-93)	75,3 ± 6,9 (71,8-78,7)			78, IQR 76-82 (69-89)
Makrofagit (solua/μl)		76,4 ± 48,2 (50,7-102,1)			269, IQR 225-289 (194-375)
Lymfosyytit (%)	7 ± 5 (1-19)	13,2 ± 5,8 (10,3-16,1)			16, IQR 14-19 (9,2-21)
Lymfosyytit (solua/μl)		15,0 ± 13,7 (7,7-22,3)			56, IQR 42-63 (39-79)
Neutrofiilit (%)	5 ± 5 (1-27)	4,9 ± 3,8 (3,0-6,8)	11,6	12,3	4,5, IQR 3,1-4,7 (0,9-6,2)
Neutrofiilit (solua/μl)		6,4 ± 7,1 (2,6-10,2)			14, IQR 11-17 (2,8-18)
Eosinofiilit (%)	6 ± 5 (0-19)	3,6 ± 4,7 (1,2-6,0)	2,7	3,8	0,4, IQR 0,0-0,6 (0,0-2,0)
Eosinofiilit (solua/μl)		3,5 ± 5,0 (0,8-6,2)			1,5, IQR 0,0-1,8 (0,0-5,6)
Mastsolut (%)	1 ± 1 (0-5)	2,2 ± 1,7 (1,3-3,0)			0,3, IQR 0,0-0,4 (0,0-0,9)
Mastsolut (solua/μl)		2,0 ± 1,8 (1,0-3,0)			1,1, IQR 0,0-1,6 (0,0-1,8)
Epiteelisolut (%)	1 ± 1 (0-12)	0,6 ± 0,7 (0,2-0,9)			0,2, IQR 0,0-0,4 (0,0-1,8)
Epiteelisolut (solua/μl)		0,6 ± 1,0 (0,1-1,1)			0,9, IQR 0,0-1,4 (0,0-6,3)
Plasmasolut (%)		0,3 ± 0,4 (0,1-0,5)			0,0, IQR 0,0-0,0 (0,0-0,6)
Plasmasolut (solua/μl)		0,2 ± 0,3 (0,1-0,4)			0,0, IQR 0,0-0,0 (0,0-2,1)

Hawkinsin ym. (1990) esittämät tulokset ovat kuudelta kliinisesti, radiologisesti ja histologisesti terveeltä koiralta. Rajamäen ym. (2001) tutkimuksen tulokset ovat 16 terveeltä aikuiselta beaglelta. Hirtin ym. (2010) tutkimuksessa vertailtiin larynx-maskin ja happikatetrin käytön vaikutuksia keuhkohuuhtelunäytteen tuloksiin sytologian ja bakteeriviljelyiden osalta terveillä beagleilla. Tutkimukseen osallistui 10 beaglea, jotka jaettiin ryhmiin A ja B. Molemmille ryhmille suoritettiin keuhkohuuhtelut ensin larynx-maskia ja sitten henkitorveen laitettavaa happikatetria käyttäen (tai päinvastoin) siten, että huuhteluiden välillä oli neljä viikkoa. A-ryhmälle tehtiin keuhkohuuhtelu ensin käyttäen happikatetria, ja koirien nielu oli suojaamatta. B-ryhmälle käytettiin steriiliä larynx-maskia, minkä läpi endoskooppi vietiin alempiin hengitysteihin. Neljä viikkoa myöhemmin A-ryhmälle käytettiin larynx-maskia ja B-ryhmälle happikatetria (Hirt ym. 2010). Tulokset molemmilla ryhmillä olivat hyvin samanlaiset, ja taulukossa 1 on esitetty A- ja B-ryhmien tulosten keskiarvot larynx-maskia käytettäessä ja happikatetria käytettäessä. Heikkilän ym. (2011) tutkimuksesta otetut arvot ovat 12 terveeltä valkoiselta länsiylämaanterrieriltä, jotka toimivat verrokkiryhmänä tutkittaessa löydöksiä idiopaattista keuhkofibroosia sairastavilta valkoisilta länsiylämaanterriereiltä.

Kuten taulukon 1 perusteella voi päätellä, terveellä koiralla sytologisissa näytteissä dominoivia soluja ovat alveolaariset makrofagit (Rha & Mahony 1999, Rajamäki ym. 2001, Andreasen 2003, Hawkins 2004). Seuraavaksi yleisimpiä soluja terveellä koiralla ovat tyypillisesti lymfosyytit (Hawkins 2004). Hawkinsin (2004) mukaan lymfosyyttejä voi joskus olla vaikea erottaa pienistä makrofageista, mikä saattaa myös heijastua tuloksiin. Tarvittaessa solujen erottelussa voidaan hyödyntää immunofluoresenssia, immunosytokemiallisia menetelmiä ja virtausytometriaa (Hawkins 2004).

Neutrofiilien määrä on yleensä suurin ensimmäisessä näyteboluksessa, mutta seuraavissa samasta keuhkolohkosta otetuista boluksissa niiden määrä laskee. Myös eosinofiileja voi olla terveen koiran näytteessä runsaasti. Niiden määrä voi vaihdella suuresti eri huuhtelukertoina, joten tulos on tulkittava yhdessä solujen kokonaismäärän, potilaan sairaus- ja hoitohistorian sekä muun tehdyn diagnostiikan tulosten kanssa (Hawkins 2004).

Hawkinsin (2004) mukaan epiteelisoluja on yleensä alle 5 % tumallisista soluista, ja tätä suuremmat määrät viittaisivat ylemmistä hengitysteistä saadun näyttemateriaalin lisääntyneeseen osuuteen näytteessä. Osittain tästä syystä ilman bronkoskopiaa otetuissa NB-BAL-näytteissä epiteelisolujen määrä voi olla suuri (Hawkins 2004).

Potilaan inflammatorista vastetta arvioitaessa painotus on solujen suhteellisissa osuuksissa, koska ne ovat riippumattomia saadun näytteen tilavuudesta, mikäli saatu näyte vain on riittävän kattava (Hawkins 2004, De Lorenzi ym. 2009). Hawkinsin ym. (1995) tekemän tutkimuksen perusteella yli 12 %:n osuus neutrofiilejä viittaa neutrofiiliseen tulehdukseen, yli 14 %:n osuus eosinofiilejä eosinofiiliseen tulehdukseen ja yli 16 %:n osuus lymfosyyttejä lymfositääriseen tulehdukseen. Jos solujen kokonaismäärä on kovin alhainen, on huuhtelu saattanut tapahtua pääosin keuhkoputkissa eikä alveolitasolla, jolloin solujen suhteellisetkaan osuudet eivät korreloi alveolitason tilanteeseen (Hawkins 2004, De Lorenzi ym. 2009).

Mercier ym. (2011) ovat tutkimuksessaan arvioineet iän merkitystä bronkoskopian ja keuhkohuuhtelunäytteiden löydöksiin terveillä koirilla. Tutkimukseen osallistui 30 beaglea. Havaittiin, että nuorten (ikäryhmä 10 kuukautta – 4,5 vuotta) koirien keuhkohuuhtelunäytteissä oli suhteessa enemmän neutrofiilejä kuin keski-ikäisillä (ikäryhmä 5–8 vuotta) tai vanhoilla (ikäryhmä yli 8 vuotta) koirilla, ja suhteessa enemmän lymfosyyttejä kuin keski-ikäisillä koirilla. Tutkimuksen perusteella koiran iällä on merkitystä keuhkohuuhtelunäytteen sytologiseen koostumukseen, ja näytteiden tuloksia tulisikin tulkita koiran ikä huomioon ottaen (Mercier ym. 2011).

### **2.1.7 Bakteeriviljely**

Bakteeriviljelyn osalta on otettava huomioon, että terveilläkin eläimillä on bakteereita ylemmissä hengitysteissä. Heikentyneet ilmatiehyiden puhdistusmekanismit lisäävät bakteeripitoisuutta. Siten esim. kroonista bronkiittia, bronkiektasiaa tai ciliary dyskinesiaa (värekarvojen toimintahäiriö) sairastavilla eläimillä voidaan havaita kasvua bakteeriviljelyssä. Tämä ei

kuitenkaan automaattisesti viittaa varsinaiseen hengitystieinfektioon (Hawkins 2004).

Ihmislääketieteen puolella ajatellaan, että infektiin on viitteitä, jos keuhkohuuhtelunäytteen bakteeriviljelyn tulos on suurempi kuin  $10^3$  pesäkettä muodostavaa yksikköä millilitrassa (Souweine ym. 1998). Peetersin ym. (2000) tutkimuksen mukaan koirilla keuhkohuuhtelunäytteen bakteeriviljelyn tulosten kynnysarvona voitaisiin pitää  $1,7 \times 10^3$  pesäkettä muodostavaa yksikköä millilitrassa. Tämän tai tätä suuremman tuloksen saaneilla koirilla havaittiin tutkimuksessa selkeitä viitteitä alempien hengitysteiden infektiin (Peeters ym. 2000).

Alempien hengitysteiden infektio voidaan diagnosoida myös silloin, kun sytologisissa näytteissä havaitaan solunsisäisiä bakteereita (Hawkins 2004, Johnson 2010). Jos tarkastellaan 50 sattumanvaraista kenttää mikroskoopilla 100-kertaisella suurennoksella, kynnysarvona infektion toteamiselle voidaan pitää kahta havaittua solunsisäistä bakteeria (Peeters ym. 2000). Viljelytulos tulee aina yhdistää bronkoskopialöydöksiin ja keuhkohuuhtelunäytteen sytologiaan: jos bronkoskopiassa havaitaan viitteitä purulentista infektiosta, ja keuhkohuuhtelunäytteen sytologia ja viljelytulokset viittaavat samaan, voidaan ajatella, että kyseessä on todellinen bakteeritulehdus. *Simonsiella*-bakteerien ja levyepiteelisolujen havaitseminen sytologisissa näytteissä viittaa kontaminaatioon suusta, mikä on huomioitava viljelytulosten tulkinassa (Creedy 2009, Johnson 2010).

Alempien hengitysteiden infektio on epätodennäköinen, jos neutrofiilejä havaitaan keuhkohuuhtelunäytteen sytologisissa tutkimuksissa hyvin vähäisiä määriä. Tulkinan kannalta ongelmallisia ovat tilanteet, joissa neutrofiilejä löydetään näytteestä runsaasti, mutta solunsisäisiä bakteereita ei havaita, ja viljelyssä havaitaan kasvua vasta rikastuksen myötä. Tällaisissa tilanteissa infektio on epätodennäköinen, mutta esim. eläimen näytteenottoa edeltävä antibioottihoito tai hyvin laimea näyte saattaa vääristää tuloksia (Hawkins ym. 1995).

Johnsonin (2010) mukaan jopa noin kolmanneksessa terveiden koirien keuhkohuuhtelunäytteiden viljelyistä havaitaan jonkinlaista kasvua, useimmiten sekakasvua. Kontaminaatio ylemmistä hengitysteistä näytteenoton yhteydessä on siis melko tavallista, ja tämä on hyvä tiedostaa näytettä otettaessa (Johnson 2010). Usein eläinlääkärit suosittelevat keuhkohuuhtelunäytteen ottamista potilaalta vasta silloin, kun antibioottihoito tai -hoidot eivät ole tehonneet toivotusti. Potilaalle annettu toimimattomaksikin koettu antibiootti voi kuitenkin säilyä keuhkokudoksessa pitkään, ja vaikuttaa keuhkohuuhtelunäytteen tuloksiin yli viikon ajan hoidon lopettamisesta (Hawkins ym. 1995).

Kuten aiemmin on mainittu, Hirtin ym. (2010) tutkimuksessa vertailtiin larynx-maskin ja happikatetrin käytön vaikutuksia keuhkohuuhtelunäytteen tuloksiin sytologian ja bakteeriviljelyiden osalta terveillä beagleilla. Tutkimuksessa havaittiin, että erot bakteeriviljelyiden tuloksissa bakteerilajien monimuotoisuuden tai pesäkelukumäärien (pmy/ml, pesäkettä muodostavaa yksikköä millilitrassa näytettä) osalta eivät olleet merkittäviä, vaikka tutkijoiden oletus oli, että suun ja nielun suojaaminen olisi vähentänyt keuhkohuuhtelunäytteen kontaminoitumista suulle ja nielulle tyypillisellä mikroflooralla (Hirt ym. 2010).

## **2.2 Lymfosyytit**

### **2.2.1 Määritelmä**

Lymfosyytit eli imusolut ovat valkosoluja, jotka osallistuvat elimistössä vieraan materiaalin tunnistamis- ja tuhoamisprosesseihin, ja siten suojaavat elimistöä erilaisilta taudinaiheuttajilta, kasvainsoluilta ja muilta vierailta molekyyleiltä (Delves ym. 2006, Salmi & Meri 2011). Lymfosyytit syntyvät luuytimessä, ja niitä on runsaasti imusolmukkeissa, kateenkorvassa, pernassa, luuytimessä, nielu- ja kitarisoissa sekä suoliston imukudoksessa. Osa lymfosyyteistä kiertää verenkierrrossa ja imunesteessä (Salmi & Meri 2011). Normaalitilanteessa veren

valkosoluista noin 20–30 % on lymfosyyttejä. Lymfosyyttien elinikä vaihtelee muutamasta vuorokaudesta useisiin vuosiin (Delves ym. 2006).

### **2.2.2 Jaottelu**

Lymfosyytit jaetaan kahteen pääryhmään, joita ovat T-lymfosyytit ja B-lymfosyytit. Ryhmät ovat solumorfologioidensa osalta keskenään samanlaisia (Delves ym. 2006, Williams & Finnegan 2015). Molempien ryhmien soluissa tuman kromatiini on hyvin tiivistä, mikä vuoksi tuma värjäytyy voimakkaasti. Tästä on apua valkosolujen erittelylaskennassa, kun lymfosyytit halutaan erottaa muista valkosoluista (Delves ym. 2006).

T- ja B-lymfosyytit eroavat toisistaan pintarakenteidensa, tehtäviensä ja toimintojensa osalta (Delves ym. 2006, Williams & Finnegan 2015). Lymfosyyttien eri alaryhmät voidaan erottaa toisistaan immunosytokemiallisesti solujen pinnalla olevien CD- eli cluster of differentiation -molekyylien perusteella (Delves ym. 2006).

### **2.2.3 Tuotanto ja kypsyminen**

Kaikkien lymfosyyttien kantasolutuotanto tapahtuu luuytimessä. B-solut jatkavat myös erilaistumistaan luuytimessä (Delves ym. 2006, Salmi & Meri 2011). B-solujen esiasteet kertyvät luun sisäpinnan (endosteumin) alle, josta ne kypsymisen myötä siirtyvät kohti luuydinontelon keskustaa ja vapautuvat edelleen sinusten kautta verenkiertoon. T-solujen esiasteet sen sijaan siirtyvät verenkierron kautta kateenkorvan kuoriosaan. Kypsyessään ne liikkuvat kohti kateenkorvan ydintä, josta ne vapautuvat verenkiertoon naiiveina T-soluina (Salmi & Meri 2011).

Imukudoksissa B-solut sijaitsevat kuorikerroksen follikkeleissa, T-solut follikkeleiden ulkopuolella parakorteksissa. Kemokiinit ohjaavat B- ja T-solujen liikkumista, ja vaikuttavat niiden erilaisiin sijainteihin imukudoksessa (Salmi & Meri 2011).

## 2.2.4 Toiminta ja tehtävät

Toimiva immuunijärjestelmä on pitkälle kehittynyt kokonaisuus, joka muodostuu synnynnäisestä ja hankitusta immuniteetista. Nämä toimivat yhteistyössä suojaten eläintä erilaisilta taudinaiheuttajilta, estäen syövän syntyä sekä poistaen kuolleita ja viallisia soluja (Sjaastad ym. 2010, Tizard 2013).

Synnynnäinen immuniteetti reagoi joka kerta samalla tavalla elimistöä uhkaaviin vieraisiin molekyyleihin ja taudinaiheuttajiin, eikä kehitä nk. muistisoluja (Tizard 2013). Synnynnäinen immuniteetti estää taudinaiheuttajia ja vieraita molekyylejä pääsemästä elimistöön fyysisten esteiden (ehjä, terve iho ja limakalvot), fagosytoivien solujen sekä komplementin muodostavien proteiinien avulla (Sjaastad ym. 2010).

Jos taudinaiheuttaja ei tuhoudu synnynnäisen immuniteetin toimesta, käynnistyy hankittu immuniteetti, jolle ominaista on immunologinen muisti (Delves ym. 2006, Tizard 2013). T- ja B-lymfosyytit ovat osallisina hankitussa immuunivasteessa sekä sen muodostumisen että ylläpidon osalta (Delves ym. 2006), ja niiden toiminta kohdistuu erityisesti elimistöä uhkaaviin taudinaiheuttajiin (Sjaastad ym. 2010). Aktivoituakseen T- ja B-solujen tulee tunnistaa antigeenejä, eli sellaisia molekyylejä, joita ei tunnisteta elimistön omiksi rakenteiksi (Sjaastad ym. 2010). Antigeenin tunnistaminen ja siten immunologisen muistin toiminta edellyttää aiempaa tai riittävän pitkäkestoista kohtaamista kyseisen taudinaiheuttajan kanssa (Delves ym. 2006). Immuunijärjestelmä reagoi taudinaiheuttajaan voimakkaammin ja nopeammin, jos kyseinen rakenne on kohdattu aiemminkin (Tizard 2013).

Hankittu immuniteetti koostuu humoraalisesta eli vasta-ainevälitteisestä immuniteetista sekä soluvälitteisestä immuniteetista (Tizard 2013). B-lymfosyyttien toiminta kohdistuu humoraaliseen immuniteettiin ja T-lymfosyyttien soluvälitteiseen immuuniteettiin (Williams & Finnegan 2015). B-lymfosyyttien pinnalla olevat vasta-aineet eli immunoglobuliinit jaetaan niiden rakenteiden perusteella viiteen luokkaan, jotka ovat IgA, IgE, IgG, IgM ja IgD



(Tizard 2013). B-solun pinnalla oleva immunoglobuliini toimii antigeenireseptorina, johon tiettyntyyppinen antigeeni kiinnittyy. Kiinnittymisen avulla elimistö voi tunnistaa solunulkoisessa tilassa olevia antigeenejä (Delves ym. 2006, Sjaastad ym. 2010). Kun antigeeni tunnistetaan, seurauksena on sen tunnistaneen B-solutyypin solukloonien lisääntyminen ja edelleen kypsyminen plasmasoluiksi, joiden tehtävänä on erittää verenkiertoon immunoglobuliineja (Sjaastad ym. 2010). Verenkiertoon vapautuneiden immunoglobuliinien tehtävänä taas on aktivoida komplementtijärjestelmää, inaktivoida toksiineja, opsonoida taudinaiheuttajia ja estää mikrobien pääsyä elimistön soluihin sitoutumalla niiden pintaan. Kukin B-soluklooni voi tuottaa vain yhdentyypisiä immunoglobuliineja, jotka taas pystyvät sitomaan vain yhdenlaisia antigeeneja (Sjaastad ym. 2010).

T-lymfosyytit tunnistavat reseptoriensa avulla solujen pinnalla oleviin MHC- eli major histocompatibility complex -molekyyleihin sitoutuneita antigeeneja. Tietty reseptori voi tunnistaa vain yhdenlaisen antigeenin (Sjaastad ym. 2010). MHC I – luokan molekyylejä on kaikkien elimistön solujen pinnalla. Kun soluun pääsee elimistölle vierasta materiaalia, kuten taudinaiheuttajia, solu esittelee MHC I – molekyyleihin sitoutuneita antigeeneja tappaja-T-soluille. Tappaja-T-solu tunnistaa sille spesifisen antigeenin MHC I –molekyyliin sitoutuneena ja tuhoaa solun (Tizard 2013).

MHC II –luokan molekyylejä on B-solujen, makrofagien ja dendriittisolujen pinnalla. Yksi kyseisten solujen tehtävistä on esitellä antigeeneja auttaja-T-soluille (Tizard 2013). Kun auttaja-T-solu tunnistaa MHC II –luokan molekyyliin sitoutuneen antigeenin, se alkaa tuottaa ja erittää sytokiineja. Sytokiinit toimivat viestinviejinä: ne aktivoivat immuunijärjestelmän soluja ja ovat mukana tulehdusreaktiossa. Osa sytokiineista aktivoi T-solujen ja makrofagien toimintaa ja osa B-solujen toimintaa (Tizard 2013). Humoraalinen ja soluvälitteinen immunitetti toimivat siis tiiviisti yhteistyössä (Sjaastad ym. 2010, Tizard 2013).

Lymfositit aktivoituvat lähinnä järjestäytyneissä imukudoksissa, kuten imusolmukkeissa (Hänninen 2011). Lymfositin aktivoituminen sekä sen seurauksena tapahtuva solunjakautuminen ja erilaistuminen vaativat antigeenin

kohtaamisen lisäksi useita signaaleja, joita veressä tai imunesteessä kiertävä solu ei voi vastaanottaa (Delves ym. 2006, Hänninen 2011). Imusolmukkeiden rakenne on aktivaatiolle suotuisa, ja niiden sijainti on sopivasti verenkierron ja imunestekierron välissä. Imusolmukkeiden läpi myös kulkeutuu kudoksista lähtöisin oleva imuneste, jonka mukana liikkuu kudoksissa olevia soluja ja niiden kappaleita. Immuunijärjestelmä pystyy tällä tavoin ikään kuin valvomaan kyseistä materiaalia erilaisten elimistölle haitallisten tekijöiden varalta. Verenkierrosta antigeenit suodattuvat pernan imukudokseen ja suolistosta suoliliepeen imusolmukkeihin sekä Peyerin levyihin. Järjestäytynyt rakenne takaa tehokkaasti ja oikeaan aikaan oleellisten solukontaktien syntymisen (Hänninen 2011).

Imunesteen mukana kulkeutuvien antigeenien on oltava muodossa, jossa ne pystyvät sitoutumaan lymfosyyttien antigeenireseptoreihin. B-solujen antigeenireseptorit tunnistavat kokonaisia proteiineja, glykoproteiineja ja hiilihydraatteja, eivätkä ne siten tarvitse erityistä antigeenin esittelyä. T-solujen antigeenireseptorit sen sijaan tunnistavat vain peptidejä, jotka ovat sitoutuneet omiin MHC-molekyyleihinsä (Delves ym. 2006, Hänninen 2011). Siten ne vaativat antigeenien esikäsittelyn fagosytoivassa solussa ja edelleen pilkkoutuneiden peptidien esittelyn fagosytoivan solun pinnan MHC-molekyylissä (Hänninen 2011).

### **2.3 Lymfocytoosi koiran keuhkohuuhtelunäytteessä eri keuhkosairauksissa**

Lymfocytoosia tavataan ihmisillä keuhkohuuhtelunäytteessä mm. hypersensitiivisen pneumoniitin (allerginen alveoliitti), sarkoidoosin, beryllioosin, lymfoproliferatiivisten sairauksien, lymfosyyttisen interstitiaalisen pneumonian (LIP) ja Langerhansin solujen histiosytoosin yhteydessä (Kebbe & Abdo 2017). Koirilla lymfocytoosin merkitystä keuhkohuuhtelunäytteessä ei täysin tunneta (Hawkins 2004). Rha & Mahony (1999) mainitsevat, että lisääntynyt reaktiivisten lymfosyyttien ja plasmasolujen lukumäärä viittaa immuunijärjestelmän stimulaatioon, mutta he eivät artikkelissaan paneudu asiaan tarkemmin. Aiheesta löytyy tietoa kirjallisuudesta vain vähän. Tässä luvussa käydään läpi muutamia

esimerkkejä sairauksista, joiden yhteydessä koiralla saatetaan havaita lymfosytoosi keuhkohuuhtelunäytteessä.

Pyogranulomatoottisen hengitystietulehduksen yhteydessä keuhkohuuhtelunäytteessä havaitaan lisääntynyt määrä makrofageja yhdessä neutrofiilien kanssa. Myös lymfosyyttien ja eosinofiilien määrä voi olla tavallista suurempi. Pyogranulomatoottinen tulehdus voi johtua esim. kroonistuneesta aspiraatiopneumoniasta, bronkiektasiasta, savun hengittämisestä, kasvaimesta tai sieni-infektiosta (Johnson 2010).

Hawkins ym. (1993) vertailivat keuhkohuuhtelua, henkitorven huuhtelua ja rintaontelon röntgenkuvausta diagnostisina menetelminä, kun tarkoituksena oli arvioida, onko multisentrinen pahanlaatuinen lymfooma levinnyt keuhkoihin. Mukana tutkimuksessa oli 47 multisentristä pahanlaatuista lymfoomaa sairastavaa koiraa, joista 66 %:lla löydettiin viitteitä kyseisestä sairaudesta keuhkolohkojen alueelta. Näiltä koirilta löydettiin keuhkohuuhtelunäytteen sytologisissa tutkimuksissa morfologisesti epänormaaleja lymfosyyttejä. Tutkimuksessa havaittiin, että keuhkohuuhtelunäytteen tumallisten solujen kokonaismäärä, suhteellinen lymfosyyttien osuus ja absoluuttinen lymfosyyttien lukumäärä olivat suurempia multisentristä lymfoomaa sairastavilla koirilla kuin histologisesti terveillä koirilla. Keuhkohuuhtelunäytteen avulla pystyttiin havaitsemaan herkemmin keuhkojen osallisuus multisentriseen lymfoomaan kuin rintaontelon röntgenkuvien tai henkitorven huuhtelun avulla (Hawkins ym. 1993).

Johnsonin (2010) mukaan keuhkohuuhtelunäytteessä voidaan nähdä interstitiaalisten keuhkosairauksien yhteydessä suurentuneita määriä lymfosyyttejä ja/tai nondegeneratiivisten neutrofiileja, mutta nämä ovat löydöksiä epäspesifejä. Heikkilä-Laurilan & Rajamäen (2014) mukaan idiopaattista keuhkofibroosia, joka luetaan myös interstitiaalisiin keuhkosairauksiin (Johnson 2010), sairastavilla koirilla pikemminkin lymfosytoosin puuttuminen keuhkohuuhteen solukuvasta tukee sairausdiagnoosia. Heikkilän ym. (2011) tutkimuksessa verrattiin 12 idiopaattista keuhkofibroosia sairastavaa valkoista länsiylämaanterrieriä 14 samanrotuiseen

terveeseen verrokkiin mm. keuhkohuuhtelunäytteen solukuvan osalta. Tutkimuksessa keuhkohuuhtelunäytteen lymfosyyttien määrä korreloi positiivisesti valtimoverinäytteen happiosapaineen kanssa, ja terveiden verrokkien ryhmässä keuhkohuuhtelunäytteen lymfosyyttien määrä oli suurempi kuin keuhkofibroosia sairastavilla (Heikkilä ym. 2011).

Whitneyn ym. (2013) tapauselostuksessa kerrotaan australialaisesta bullmastiffin pennusta, jolle oli diagnosoitu hypersensitiivinen pneumoniitti. Se on pääasiassa ihmisillä raportoitu oireyhtymä, joka aiheutuu, kun hyvin pieniä orgaanisia hiukkasia pääsee keuhkojen alveolaaritilaan, jossa ne käynnistävät IgG-välitteisen immunologisen reaktion (Whitney ym. 2013, Riario Sforza & Marinou 2017, Vasakova ym. 2017). Oireet ovat moninaisia ja hyvin vaihtelevia (Riario Sforza & Marinou 2017). Ihmisillä lymfosytoosia keuhkohuuhtelunäytteessä pidetään yhtenä hypersensitiiviseen pneumoniittiin viittaavana tekijänä, sillä yli 80 %:lla hypersensitiivistä pneumoniittia sairastavista ihmisistä huuhtelunäytteessä on enemmän kuin 20 % lymfosyyttejä (Vasakova ym. 2017). Whitneyn ym. (2013) tapauselostuksen koiran oireilun olivat aiheuttaneet kaulusmaatähden (*Geastrum triplex*, eräs sienilaji) itiöt. Tällä koiralla keuhkohuuhtelunäytteessä 50 % soluista oli neutrofiileja, 25 % makrofageja ja 25 % pieniä lymfoideja soluja (Whitney ym. 2013).

Reijulan ym. (1995) tutkimuksessa kuudelle koiralle indusoiatti hypersensitiivinen pneumoniitti kesykyhykkysestä eristetyn seerumin avulla. Näillä kuudella koiralla lymfosyyttien määrä keuhkohuuhtelunäytteessä oli suurempi kuin kolmella verrokkina toimineella koiralla, joille ei annettu seerumia (Reijula ym. 1995). On kuitenkin huomioitava, että otoskoko tässä tutkimuksessa oli pieni, eikä tämän perusteella voida yleistää, että hypersensitiiviseen pneumoniittiin liittyisi aina lymfosytoosi keuhkohuuhtelunäytteessä.

## 3 TUTKIMUS

### 3.1 Aineisto ja menetelmät

#### 3.1.1 Eläimet

Tutkimusosion aineisto kerättiin käymällä läpi retrospektiivisesti eli takautuvasti kaikkien yksityisomistuksessa olevien Yliopistollisen eläinsairaalan koirapotilaiden, joille oli tehty keuhkohuuhtelu aikavälillä 9/2011 – 6/2017, potilastiedot ja laboratoriotulokset. Koiria oli yhteensä 261. Tutkimukseen mukaan valikoiduilla koirilla keuhkohuuhtelunäytteiden soluerittelyn tuloksissa lymfosyyttien suhteellinen osuus oli 16,0 % tai suurempi (vaihteluväli 16,0–60,7 %). Näillä kriteereillä mukaan tutkimukseen valikoitui 75 koiraa.

Koirien, joilla lymfosyyttien suhteellinen osuus oli 16,0 % tai suurempi, potilaskorteilta Yliopistollisen eläinsairaalan potilasohjelmasta selvitettiin takautuvasti jokaisen yksilön rotu ja sukupuoli sekä ikä, paino, kliiniset oireet ja niiden kesto keuhkohuuhtelunäytetutkimuksen hetkellä. Lisäksi selvitettiin verinäytetulokset hematologian, seerumiverinäytteiden sekä verikaasujen ( $pO_2$ ,  $pCO_2$  ja  $A-aO_2$ ) osalta, ulostenäytteiden (flotaatio- ja Baermann-menetelmät sekä *Giardia*-tutkimus) tulokset, rintaontelon röntgenkuvalöydökset ja keuhkohuuhtelunäytteen muut löydökset. Kyseiset tiedot taulukoitiin Microsoft Excel for Mac 2011 -ohjelman avulla. Seerumiverinäytteiden tuloksia ei käsitellä tässä tutkimuksessa. Yhdellä koirista oli kahdelta eri päiväältä keuhkohuuhtelunäytetulos, jossa lymfosyyttien osuus oli 16,0 % tai suurempi. Tältä koiralta mukaan aineistoon valittiin ensimmäinen tuloksista.

Koirat ryhmiteltiin oireiden syyn perusteella viiteen ryhmään, jotka on esitelty tarkemmin luvussa 3.2.1. Jos yksittäisellä koiralla ei ollut potilastietojen perusteella diagnosoitu hengitystiesairautta tai tiedot siitä olivat puutteellisia, koira jätettiin tutkimuksen ulkopuolelle. Lopullisessa aineistossa on mukana yhteensä 64 koiraa. Näiden lisäksi ryhmien ulkopuolelle niihin sopimattomana,

mutta tutkimuksen tulosten kannalta maininnan arvoisena, jäi yksi yksittäinen koira, jolla lymfosyyttien suhteellinen osuus keuhkohuuhtelunäytteen solukuvassa oli yli 16,0 %. Kyseinen koira sairasti idiopaattista keuhkofibroosia.

### 3.1.2 Tilastollinen käsittely

Aineiston tilastolliseen käsittelyyn käytettiin IBM SPSS Statistics 24 –ohjelmaa (Chicago, USA). Normaalijakautuneisuus testattiin Shapiro-Wilks –testillä, ja normaalijakauma arvioitiin grafiikan avulla (Q-Q plots). Tulokset-osiossa normaalijakauman mukaisesti jakautuneet numeeriset arvot ilmoitetaan keskiarvoina ja keskihajontoina ja ei-parametriset arvot mediaaneina ja kvartaaliväleinä. Taulukoitujen lukuarvojen (ikä, paino, oireiden kesto, hematologian tulokset, verikaasutulokset ja keuhkohuuhtelunäytteen sytologiset tulokset) väliset korrelaatiot laskettiin käyttäen normaalisti jakautuneille arvoille Pearsonin korrelaatiokerrointa ja ei-parametrisille arvoille Spearmanin järjestyskorrelaatiokerrointa ( $\rho$ ). Korrelaatiokerroin kuvaa muuttujien välistä lineaarista riippuvuutta huomioiden sekä riippuvuuden voimakkuuden että suunnan. Kerroin vaihtelee välillä -1 – +1. -1 viittaa täydelliseen negatiiviseen korrelaatioon ja +1 täydelliseen positiiviseen korrelaatioon. Jos muuttujien välillä ei ole lainkaan lineaarista riippuvuutta, kertoimen arvo on 0.

Pearsonin korrelaatiokerroin perustuu oletukseen normaalijakautuneisuudesta. Parametrien poikkeamat lineaarisuudesta eivät vaikuta Spearmanin järjestyskorrelaatioon yhtä paljon kuin Pearsonin korrelaatioon, koska Spearmanin järjestyskorrelaatio mittaa monotonista riippuvuutta kahden satunnaismuuttujan välillä. Jos muuttujien välinen hajonta on pientä, molemmat korrelaatioanalyysit antavat lähes samanlaiset arvot.

Ryhmien väliseen vertailuun yksittäisten parametrien osalta käytettiin yksisuuntaista varianssianalyysia (one-way ANOVA). Ei-parametrisille arvoille tehtiin logaritminen muunnos, jotta jakauma saatiin täyttämään mallin edellyttämä normaalijakauma. Monivertailumenetelmässä käytettiin Sidakin korjauskerrointa, joka parantaa alkuperäisen tilastollisen merkitsevyytason

säilymistä monivertailussa. Tilastollisen merkitsevyyden rajana pidettiin p-arvoa  $< 0,05$ .

## 3.2 Tulokset

### 3.2.1 Aineiston ryhmittely ja ryhmien perustiedot

Tietojen taulukoinnin jälkeen aineistoa käsiteltiin, ja koirat jaettiin oireiden syyn perusteella viiteen ryhmään. Oireiden syy eli diagnoosi perustui kaikilla koirilla esitietoihin, klinisiin löydöksiin verinäytteissä, keuhkoröntgen- ja tietokonetomografiakuvauksessa sekä keuhkohuuhtelunäytteen tutkimustuloksiin.

Ryhmän 1 ( $n = 7$ ) koirilla oli todettu krooninen bronkiitti, ja kolmella koirista oli myös bronkomalasiaa eli keuhkoputkien rakenteiden heikkoutta. Ryhmän 2 ( $n = 17$ ) koirilla oli todettu yskää tai takypneaa, mutta bronkoskopiassa ei havaittu löydöksiä. Ryhmän 3 ( $n = 12$ ) koirilla ongelma paikallistui ylähengitysteihin. Kuusi ryhmän koirista oli brakykefaalisesta oireyhtymästä (BOAS) kärsiviä muuten oireettomia englanninbulldoggeja, jotka osallistuivat rodun tutkimukseen. Muista kuudesta kahdella oli kurkunpään sairaus, yhdellä yskää, toistuvia nielutulehduksia ja ruokatorven toimintaongelma, yhdellä ylähengitysteiden ahtautta, yhdellä brakykefaalinen oireyhtymä, yskää ja regurgitointia, ja yhdellä epäiltiin mastikatorista myosiittia. Ryhmän 4 ( $n = 24$ ) koirilla oli todettu aiempi pneumonia tai *Bordetella bronchiseptica* -infektio. Ryhmän 5 ( $n = 4$ ) koirilla oli todettu aiempi eosinofiilinen bronkopneumopatia (EBP). Taulukossa 2 on esitetty ikä, paino ja oireiden kesto koko aineiston osalta ja erikseen ryhmien 1–5 osalta joko keskiarvoina ja keskihajontoina tai mediaaneina ja kvartaaliväleinä.

*Taulukko 2. Ikä, paino ja oireiden kesto koko aineiston ja ryhmien 1–5 osalta. Ikä on esitetty keskiarvoina ja keskihajontoina, paino ja oireiden kesto mediaaneina ja kvartaaliväleinä.*

	Koko aineisto	Ryhmä 1 Krooninen bronkiitti	Ryhmä 2 Hengitystieoireet ilman tähtystyslöydöksiä	Ryhmä 3 Ylähengitystie- sairaus	Ryhmä 4 Infektio- tausta	Ryhmä 5 Aikaisempi EBP
Ikä (v)	5,79 ± 3,33	8,36 ± 4,19	4,20 ± 1,95	6,45 ± 3,96	5,62 ± 3,35	8,65 ± 0,21
Paino (kg)	22,1, IQR 10,1-37,5	9,20, IQR 6,60-10,9	19,0, IQR 8,25- 26,5	23,6, IQR 20,8- 32,8	49,4, IQR 22,4-63,3	12,1, IQR 6,53-20,4
Oireiden kesto (kk)	6,00, IQR 2,00-18,0	6,00, IQR 5,00-18,0	6,00, IQR 2,25-15	13,0, IQR 1,75- 37,5	7,5, IQR 1,25-16,5	2,25, IQR 2,00-10,4

Tutkimusaineiston koirista 36 (56 %) oli narttuja ja 28 (44 %) uroksia.

Narttukoirista steriloituja oli 16 ja uroskoirista kastroiduista 6. Eri rotuja oli mukana yhteensä 32. Yleisimmät rodut olivat irlanninsusikoiria (n = 12) ja englanninbulldoggi (n = 7). Näiden jälkeen eniten oli monirotuksia koiria (n = 6).

### 3.2.2 Oireiden kuvailu

Tässä luvussa kuvaillaan aineiston koirien oireita sanallisesti ryhmittäin. Suluissa ilmoitetut luvut kertovat oireilevien koirien lukumäärän.

Ryhmän 1 (krooninen bronkiitti) koirista kaikilla (n = 7) oli esiintynyt yskää. Suurimmalla osalla koirista yskä oli kuivaa (n = 6) ja oireilua esiintyi ajoittain (n = 5). Monella rasitus ja kiihtyminen pahensivat yskää (n = 4), yhdellä pakkasen aiheutti yskän voimistumisen. Muita ryhmän koirilla havaittuja oireita olivat regurgitointi (n = 3), heikentynyt rasituksensietokyky (n = 2), lievä ajoittainen kuumeilu (n = 1), ruokahalun heikkeneminen (n = 1) ja vähentynyt juominen (n =



1). Yhdellä koirista oli havaittu uveiitti sekä pyotraumaattinen dermatiitti ("hot spot").

Ryhmän 2 (hengitystieoireet ilman tähystyslöydöksiä) koirista kaikilla (n = 17) oli esiintynyt joko yskää tai takypneaa, kahdella molempia. Yskä oli joko kuivaa (n = 11) tai produktiivista (n = 4). Osalla (n = 7) oli ajoittain myös oireettomia jaksoja. Yskän jälkeen tyypillisimmät oireet olivat hengitysmuutokset (n = 8), kuten takypnea, ilman stetoskooppia kuultavat korostuneet hengityssäät sekä ajoittainen dyspnea. Ryhmän koirilla havaittuja muita oireita olivat aivastelu (n = 5), nk. reverse sneezing -oireilu (n = 3), sierainvuoto (n = 2), kuorsaaminen nukkuessa (n = 1), kielen sinerrys (n = 1), apatia (n = 6), heikentynyt rasituksensietokyky (n = 5), kuumeilu (n = 1), ajoittainen tärinä (n = 1), laihtuminen (n = 2), ajoittainen regurgitointi (n = 2), röyhtäily ja maiskuttelu (n = 1), heikentynyt ruokahalu (n = 1), vähentynyt juominen (n = 1), lisääntynyt virtsaaminen (n = 1), iho-oireet (n = 3), pahanhajuinen hengitys (n = 1) ja huonokuntoinen turkki (n = 1).

Ryhmän 3 (ylähengitystiesairaus) koirista (n = 12) oireilevien (n = 6) koirien yleisin oire oli yskä (n = 5), joka oli tyypillisimmin kuivaa (n = 4) ja ajoittaista (n = 4). Muita ryhmän koirilla havaittuja oireita olivat kohtauksittainen dyspnea ja rohiseva hengitys (n = 1), läähättely (n = 1), stridor-äänet rasituksen yhteydessä (n = 1), nk. reverse sneezing -tyyppinen oireilu (n = 1), nielemisvaikeudet (n = 2), vaikeutunut suun avaaminen ja haukkumisen väheneminen (n = 1), haukkuäänen muutos kimeämmäksi (n = 1), kielen kirkkaanpunainen väri hetkellisesti (n = 1), apatia (n = 3), ruokahalun heikentyminen (n = 3), heikentynyt rasituksensietokyky (n = 2), juomisen lisääntyminen (n = 2), juomisen väheneminen (n = 1), lisääntynyt virtsaaminen (n = 1), regurgitointi ja oksentelu (n = 1) ja harmahtava silmävuoto (n = 1). Kuusi ryhmän koirista oli englanninbulldoggeja, joilla ei brakykefaalisen oireyhtymän lisäksi ollut havaittu oireita.

Myös ryhmän 4 (infektiotausta) koirilla (n = 24) yskä oli yleisin oire. Yskä oli lähes kaikilla ajoittaista, ja sekä kuivaa (n = 8) että produktiivista (n = 7) yskää esiintyi.

Muita ryhmän koirilla esiintyneitä oireita olivat läähättely (n = 2), hengittäminen puuskuttaen kaula suorana (n = 1), pääasiassa kostaalinen hengitys (n = 1), ajoittainen dyspnea (n = 1), ajoittainen aivastelu (n = 2), bilateraalinen sierainvuoto (n = 5) (purulentti (n = 3) tai kirkas vuoto (n = 2)), runsas kuolaaminen (n = 1), haukkuäänen muutos aiempaa kimeämmäksi (n = 1), kuumeilu (n = 4), apatia (n = 6), heikentynyt rasituksensietokyky (n = 4), heikentynyt ruokahalu (n = 4), vähentynyt juominen (n = 3), ajoittainen oksentelu (n = 3), röyhtäily (n = 2), regurgitointi (n = 1), laihtuminen (n = 1), tihentynyt virtsaaminen (n = 1), jäykkyys makuulta noustessa (n = 1) ja niskan sekä lavan alueen kipu (n = 1).

Ryhmän 5 (aikaisempi EBP) koirilla (n = 4) esiintyi produktiivista (n = 2) tai kuivaa (n = 1) yskää, nk. reverse sneezing -oireilua (n = 1), regurgitointia (n = 1), heiken-tyntä ruokahalua (n = 1) sekä turvotusta vulvan ja peräaukon alueella (n = 1).

### **3.2.3 Hematologia**

Aineiston koirilta tutkittiin verinäytteistä hematologian osalta leukosyytit eli valkosolut, liuska- ja sauvatumaiset neutrofiilit, lymfosyytit, monosyytit, eosinofiilit ja basofiilit. Tulokset on esitetty taulukossa 3 koko aineiston sekä erikseen ryhmien 1-5 osalta. Lymfosyyttien osalta tulokset on ilmoitettu keskiarvoina ja keskihajontoina, muilta osin tulokset on ilmoitettu mediaaneina ja kvartaaliväleinä. Kahdelta aineiston koiralta (toinen ryhmästä 1 ja toinen ryhmästä 2) ei ollut tuloksia saatavilla.

*Taulukko 3. Hematologian tulokset koko aineiston ja ryhmien 1–5 osalta. Tulokset on ilmoitettu mediaaneina ja kvartaaliväleinä, paitsi lymfosyyttien osalta tulokset on ilmoitettu keskiarvoina ja keskihajontoina. Solut-sarakkeessa ilmoitetaan suluissa kunkin solutyypin viitearvot. Neutrofiilien yhteydessä lt viittaa liuskatumaisiin ja st sauvatumaisiin neutrofileihin.*

Solut	Koko aineisto	Ryhmä 1 Krooninen bronkiitti	Ryhmä 2 Hengitystieoireet ilman tähtystyslöydöksiä	Ryhmä 3 Ylähengitystie- sairaus	Ryhmä 4 Infektio- tausta	Ryhmä 5 Aikaisempi EBP
Leukosyytit (5,4-17,4)	8,65, IQR 6,93-11,5	9,56, IQR 8,44-9,88	8,18, IQR 6,79- 10,3	8,72, IQR 7,01- 11,6	8,76, IQR 6,65-12,0	10,2, IQR 5,38-12,2
Neutrofiilit, lt (2,9-13,8)	5,74, IQR 4,62-7,60	5,63, IQR 5,21-6,55	5,30, IQR 4,38- 7,20	5,66, IQR 4,85- 8,90	7,09, IQR 4,58-8,30	5,25, IQR 3,10-7,18
Neutrofiilit, st (0-0,1)	0, IQR 0	0, IQR 0	0, IQR 0	0, IQR 0	0, IQR 0	0, IQR 0
Lymfosyytit (1,0-5,4)	1,94 ± 0,95	1,87 ± 1,01	2,12 ± 0,68	1,92 ± 0,60	1,81 ± 1,23	2,20 ± 1,07
Monosyytit (0,1-1,1)	0,39, IQR 0,28-0,58	0,40, IQR 0,31-0,74	0,38, IQR 0,23- 0,57	0,38, IQR 0,27- 0,57	0,40, IQR 0,29-0,67	0,40, IQR 0,23-0,53
Eosinofiilit (0,1-1,5)	0,33, IQR 0,14-0,60	0,81, IQR 0,50-1,53	0,39, IQR 0,12- 0,77	0,30, IQR 0,20- 0,43	0,17, IQR 0,04-0,58	0,64, IQR 0,38-2,80
Basofiilit (0,0- 0,1)	0,01, IQR 0- 0,02	0,05, IQR 0- 0,30	0,02, IQR 0-0,03	0,02, IQR 0-0,02	0,01, IQR 0- 0,02	0,04, IQR 0,02-0,46

### 3.2.4 Verikaasut

Verikaasujen osalta mukaan tutkimukseen otettiin arvot pCO<sub>2</sub> (hiilidioksidin osapaine), pO<sub>2</sub> (hapen osapaine) ja A-aO<sub>2</sub> (alveolaarisen hapen ja valtimoveren hapen pitoisuuksien erotus). Tulokset on esitetty taulukossa 4 koko aineiston ja erikseen ryhmien 1–5 osalta keskiarvoina ja keskihajontoina tai mediaaneina ja kvartaaliväleinä.

Taulukko 4. Verikaasu-tulokset koko aineiston ja ryhmien 1–5 osalta. Tulokset on ilmoitettu keskiarvoina ja keskihajontoina, paitsi A-aO<sub>2</sub>:n osalta tulokset on ilmoitettu mediaaneina ja kvartaaliväleinä.

		Ryhmä 1	Ryhmä 2	Ryhmä 3	Ryhmä 4	Ryhmä 5
	Koko aineisto	Krooninen bronkiitti	Hengitystieoireet ilman tähtystyslöydöksiä	Ylähengitystie- sairaus	Infektio- tausta	Aikaisempi EBP
pCO <sub>2</sub> (mmHg)						
pO <sub>2</sub> (mmHg)	30,0 ± 3,44 90,1 ± 11,1	28,8 ± 3,48 86,3 ± 17,3	30,4 ± 3,50 93,3 ± 13,4	31,5 ± 1,74 85,9 ± 9,07	29,7 ± 3,98 90,5 ± 8,26	29,4 ± 1,29 88,1 ± 2,57
A-aO <sub>2</sub>	22,3, IQR 17,7-28,4	27,8, IQR 16,5-35,7	16,9, IQR 13,3- 24,7	22,4, IQR 18,2- 26,0	22,3, IQR 19- 31	29,4, IQR 25,5-29,4

### 3.2.5 Ulostenäytteet

Ryhmän 1 (krooninen bronkiitti) koirista kaikilta (n = 7) oli tutkittu ulosteen parasiitit flotaatio- ja Baermann-menetelmillä. Yhdeltäkään ei ollut löydetty näistä näytteistä viitteitä parasiiteista. *Giardia* oli tutkittu ulosteesta kahdelta koiralta, mutta tulos oli molemmilla negatiivinen.

Ryhmän 2 (hengitystieoireet ilman tähtystyslöydöksiä) koirista (n = 17) ulosteen parasiitteja oli tutkittu flotaatiomenetelmällä 13 koiralta ja Baermann-menetelmällä 14 koiralta. Tulokset olivat negatiivisia kaikkien osalta. *Giardia* oli tutkittu kuudelta koiralta, joista yhdellä tulos oli positiivinen.

Ryhmän 3 (ylähengitystiesairaus) koirista (n = 12) yhdelläkään ei havaittu ulosteen parasiitteja. Baermann-menetelmällä ulostetta oli tutkittu kuudelta oireilevalta koiralta, flotaatiomenetelmällä viideltä. *Giardia* oli tutkittu neljältä oireilevalta. Ryhmän kuudelta oireettomalta englanninbulldoggilta ulostenäytteitä ei ollut tutkittu.

Ryhmän 4 (infektio-tausta) (n = 24) koirista ulosteen parasiitteja oli tutkittu flotaatiomenetelmällä ja Baermann-menetelmällä 23 koiralta. Tulokset olivat

negatiivisia kaikkien osalta. *Giardia* oli tutkittu seitsemältä koiralta, joista yhdellä tulos oli positiivinen.

Ryhmän 5 (aikaisempi EBP) (n = 4) koirilta ei havaittu löydöksiä ulostenäytteistä. Näytteet oli tutkittu flotaatio- ja Baermann-menetelmillä kaikilta ryhmän koirilta. *Giardia* oli tutkittu kahdelta koiralta.

### **3.2.6 Rintaontelon röntgenkuvien löydökset**

Tässä luvussa kuvaillaan aineiston koirien löydökset rintaontelon röntgenkuvissa sanallisesti ryhmittäin. Suluissa ilmoitetut luvut kertovat, kuinka monella ryhmän koiralla on havaittu kyseinen muutos.

Ryhmän 1 (krooninen bronkiitti) koirista kaikilla (n = 7) havaittiin muutoksia rintaontelon röntgenkuvissa. Yleisin muutos oli bronkointerstitiaalinen keuhkokuvioitus (n = 3), joka kahdella koirista oli lievä ja yhdellä kohtalainen. Myös lievää bronkiaalista kuvioitusta (n = 2), lievää interstitiaalista kuvioitusta (n = 1) ja kohtalaista alveolaarista kuvioitusta (n = 1) esiintyi. Muita muutoksia röntgenkuvissa olivat sydämen koon lievä suurentuminen VHS- eli vertebral heart score -mittauksen perusteella (n = 2), prominentti vasen eteinen (n = 1), prominentti sydämen oikea puoli (n = 1), paikallinen atelektaasi vasemman kraniaalilohkon alueella (n = 1), lievästi paksuuntunut pleura (n = 1), henkitorven kaventuminen (n = 1), henkitorven epänormaali mutka (n = 1), suurentunut trakeobronkiaalinen imusolmuke (n = 1), nivelrikkoon viittaavat lievät muutokset olkanivelessä (n = 1), spondyloosimuutokset (n = 1), lievä rintalastan anomalia (n = 1) ja pehmytkudostiiviys (mahdollisesti ruokaa tai uudismuodostuma) paikallisesti pyloruksen tai antrumin kohdalla (n = 1).

Ryhmän 2 (hengitystieoireet ilman tähytyslöydöksiä) koirilla (n = 17) havaittiin lievää (n = 3) ja kohtalaista (n = 2) bronkiaalista keuhkokuvioitusta, lievää (n = 2) ja kohtalaista (n = 2) interstitiaalista keuhkokuvioitusta ja lievää (n = 2) ja kohtalaista (n = 1) bronkointerstitiaalista keuhkokuvioitusta. Muita havaittuja muutoksia röntgenkuvissa olivat henkitorven kaventuminen (n = 5), pieni mutka

henkitorvessa (n = 1), keuhkoputken seinämän epätasaisuus oikean kraniaalilohkon alueella (n = 1) ja sydämen koon lievä suurentuminen VHS-mittauksen perusteella (n = 1).

Ryhmän 3 (ylähengitystiesairaus) koirista kuudella oireilleella koiralla yleisin röntgenlöydös oli bronkiaalinen keuhkokuvioitus, joka oli lievää (n = 3) tai kohtalaista (n = 1). Muita löydöksiä olivat spondyloosimuutokset (n = 2), lievä interstitiaalinen keuhkokuvioitus (n = 1), henkitorven kaventuminen (n = 1), henkitorven dorsaalinen mutka (n = 1), sternaalisen imusolmukkeen suureneminen (n = 1), mineralisaatio kylkiluu-rustoliitoksissa (n = 1), rintarangan alueen nikamien anomalia (n = 1) ja luuntiheyden omaava muutos mahalaukun alueella (n = 1). Kuudelta oireilemattomalta englanninbulldogilta ei ollut otettu röntgenkuvia rintaontelosta.

Ryhmän 4 (infektio-tausta) koirilla (n = 24) yleisimmät röntgenlöydökset olivat spondyloosimuutokset (n = 8), lievä (n = 6) ja kohtalainen (n = 2) interstitiaalinen keuhkokuvioitus sekä kohtalainen (n = 5) ja voimakas (n = 2) alveolaarinen keuhkokuvioitus. Muita löydöksiä ryhmän koirien röntgenkuvissa olivat lievä (n = 2) ja kohtalainen (n = 2) bronkointerstitiaalinen keuhkokuvioitus, kohtalainen bronkiaalinen keuhkokuvioitus (n = 4), prominentti pleuralinja (n = 3), pienehkö sydämen koko VHS-mittauksen perusteella (n = 2), sydämen koon lievä suurentuminen VHS-mittauksen perusteella, lievä pleuran paksuuntuminen (n = 1), lievä atelektasi vasemman kraniaalilohkon kaudaaliosassa (n = 1), röntgenharva alue sydämen ventraalipuolella (mahdollinen lievä pneumothorax) (n = 1), henkitorven kaventuminen (n = 1), suurentunut kraniobronkiaalinen imusolmuke (n = 1) sekä nivelrikkomuutokset olkanivelessä (n = 1).

Ryhmän 5 (aikaisempi EBP) koirilla (n = 4) havaittiin vain yksittäisiä muutoksia röntgenkuvissa. Muutokset olivat kohtalainen bronkointerstitiaalinen keuhkokuvioitus (n = 1), lievä bronkiaalinen keuhkokuvioitus (n = 1) sekä pehmytkudostiiviuden omaava alue bifurkaation kohdalla (n = 1), jonka epäiltiin olevan summaatio keuhkovaltimosta.

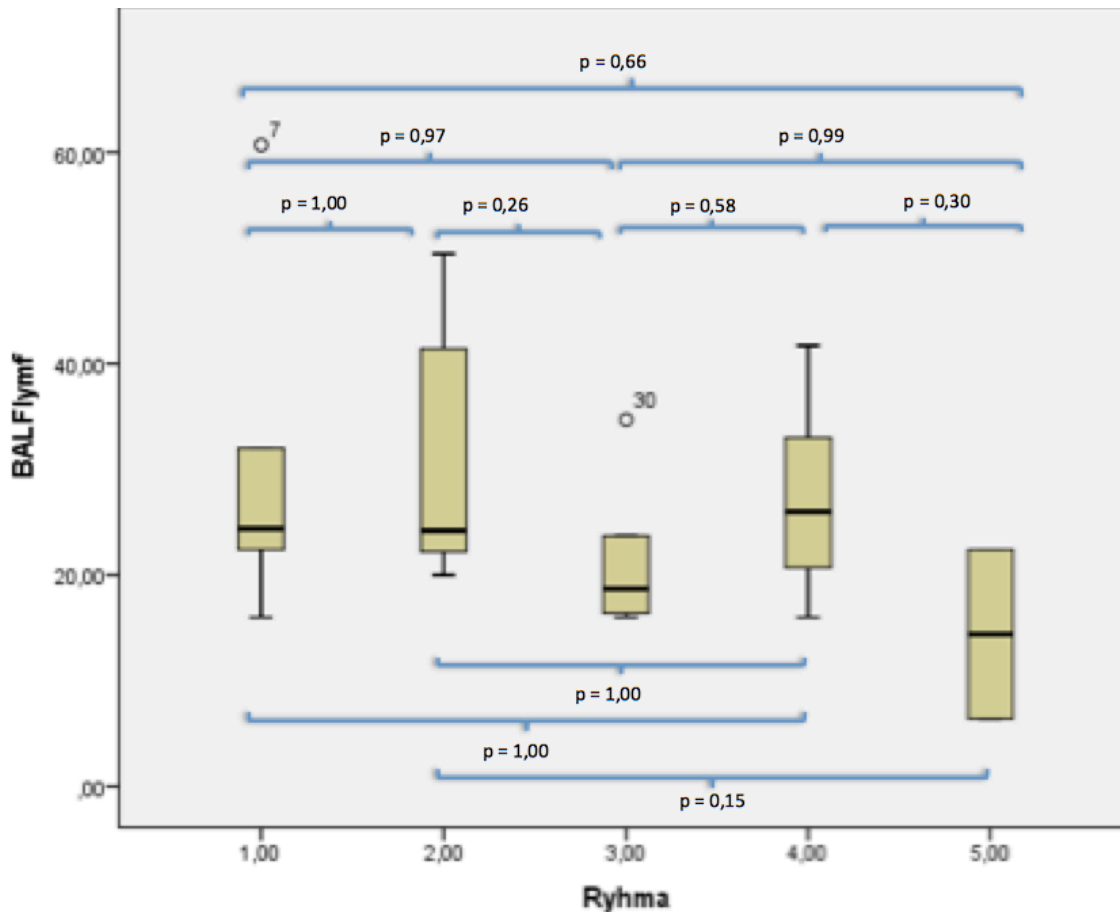
### 3.2.7 Keuhkohuuhtelunäytteet

Keuhkohuuhtelunäytteen osalta tutkimukseen otettiin mukaan solujen kokonaismäärä millilitrassa näytettä sekä erityyppisten solujen suhteelliset osuudet näytteessä. Tulokset on esitetty taulukossa 5 koko aineiston ja erikseen ryhmien 1–5 osalta mediaaneina ja kvartaaliväleinä. Kuvassa 1 nähdään tarkemmin lymfosyyttien tulokset ryhmittäin.

*Taulukko 5. Keuhkohuuhtelunäytteen sytologian tulokset koko aineiston ja ryhmien 1–5 osalta. Tulokset on ilmoitettu mediaaneina ja kvartaaliväleinä.*

Solut	Koko aineisto	Ryhmä 1 Krooninen bronkiitti	Ryhmä 2 Hengitystieoireet ilman tähtystyslöydöksiä	Ryhmä 3 Ylähengitystie- sairaus	Ryhmä 4 Infektio- tausta	Ryhmä 5 Aikaisempi EBP
Solut tot. x10E6/ml	0,24, IQ 0,15- 0,42	0,24, IQ 0,14- 1,75	0,19, IQ 0,15-0,42	0,27, IQ 0,13- 0,46	0,21, IQ 0,16- 0,42	0,22, IQ 0,16- 3,11
Makrofagit %	60,6, IQ 49,7- 69,2	57,4, IQ 38,4- 69,7	57,7, IQ 49,7-66,7	67,2, IQ 52,4- 74,5	61,4, IQ 47,1- 66,9	62,4, IQ 20,4- 67,6
Lymfosyytit %	22,6, IQ 19,8- 31,4	22,4, IQ 16,7- 32,0	23,4, IQ 21,9-37,2	19,7, IQ 17,3- 24,5	25,4, IQ 20,5- 33,0	20,6, IQ 9,48- 30,9
Neutrofiilit %	5,00, IQ 2,78- 8,70	5,70, IQ 3,00- 16,4	3,70, IQ 2,55-8,25	7,40, IQ 3,65- 10,4	4,85, IQ 2,88- 9,55	3,85, IQ 2,48- 7,78
Eosinofiilit %	1,70, IQ 0,78- 5,63	1,40, IQ 0,70- 10,0	4,70, IQ 1,00-8,70	1,70, IQ 1,48- 2,30	1,55, IQ 0,40- 3,62	4,55, IQ 1,63- 59,7
Mastsolut %	0,70, IQ 0,10- 1,70	1,00, IQ 0,00- 1,70	1,00, IQ 0,45-2,55	0,20, IQ 0,00- 1,15	0,70, IQ 0,00- 1,63	2,35, IQ 0,73- 4,80
Epiteelisolut %	0,00, IQ 0,00- 0,70	0,00, IQ 0,00- 2,00	0,00, IQ 0,00-0,20	0,00, IQ 0,00- 1,85	0,00, IQ 0,00- 0,30	0,55, IQ 0,10- 0,93

Kuvassa 1 on esitetty keuhkohuuhtelunäytteen lymfosyyttien tulokset ryhmittäin sekä ryhmien 1–5 näytetulosten välisen vertailun tulokset.



Kuva 1. Keuhkohuuhtelunäytteen lymfosyyttien tulokset ryhmittäin sekä eri ryhmien näytetulosten välisen vertailun tulokset ilmoitettuna kahden desimaalin tarkkuudella.

### 3.2.8 Korrelaatiot

Taulukoitujen lukuarvojen (ikä, paino, oireiden kesto, hematologian tulokset, verikaasutulokset ja keuhkohuuhtelunäytteen sytologiset tulokset) välisissä korrelaatioissa havaittiin, että keuhkohuuhtelunäytteen lymfosyyttien suhteellinen lukumäärä korreloi aineistossa merkittävästi keuhkohuuhtelunäytteen makrofagien suhteellisen lukumäärän kanssa ( $p$ -arvo = 0,00 ja Spearmanin korrelaatiokerroin  $r = -0,48$ ). Negatiivinen korrelaatio viittaa siihen, että lymfosyyttien suhteellisen osuuden kasvaessa makrofagien suhteellinen osuus



pienenee, ja päinvastoin makrofagien suhteellisen osuuden kasvaessa lymfosyyttien suhteellinen osuus pienenee.

Keuhkohuuhtelunäytteen lymfosyyttien osalta muita merkittäviä korrelaatioita ei löytynyt. Sen sijaan useiden muiden eri tekijöiden välillä korrelaatioita havaittiin. Havaitut merkittävät korrelaatiot on kirjattu liitteen 1 taulukkoon.

## **4 POHDINTA**

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kuvailla kliiniset ja keuhkohuuhtelunäytteen löydökset koirilla, joilla oli todettu keuhkohuuhtelunäytteessä lymfosytoosi sekä tarkastella, minkälaisiin keuhkosairauksiin lymfosytoosi näillä koirilla liittyi. Lisäksi selvitettiin, korreloiko lymfosyyttien suhteellinen lukumäärä koiran keuhkohuuhtelunäytteessä koiran iän, painon, sukupuolen, oireiden tyypin ja keston, veri- ja ulostenäytetulosten, muiden keuhkohuuhtelunäytteen tulosten ja rintaontelon röntgenlöydösten kanssa. Tulosten suora vertaaminen aiempiin tutkimustuloksiin ei ole mahdollista, koska vastaavia tutkimuksia ei olla aiemmin julkaistu.

### **4.1 Aineiston ryhmittely**

Keuhkohuuhtelunäytteen lymfosytoosi voi tässä tutkimuksessa tehdyn koirien ryhmittelyn perusteella liittyä erilaisiin sairauksiin. Kyseessä ei välttämättä ole aina alempien hengitysteiden, alveolien tai interstitiumin sairaus, vaikka keuhkohuuhtelunäytteitä otetaankin yleensä nimenomaan niitä tutkittaessa (Hawkins 2004, De Lorenzi ym. 2009). Alempien hengitysteiden sijaan ryhmän 3 koirilla ongelma paikallistui ylähengitysteihin. Ryhmän 2 koirien hengitystieoireille ei löydetty selkeää selittävää tekijää, vaikka on mahdollista, että hengitysteissä oli inflammaatio ilman keuhkoputkien seinämien silminnähtäviä muutoksia. Huomionarvoista on, että aineiston koirista saatiin selkeitä ryhmiä muodostettua. Ryhmittelyn ulkopuolelle jäi yksi koira, jolla oli todettu idiopaattinen keuhkofibroosi (keuhkoparenkyymin sairaus (Johnson 2010)). Sen

yhteydessä keuhkohuuhtelunäytteen lymfosytoosi on Johnsonin (2010) mukaan epäspesifinen löydös.

## 4.2 Ryhmien perustiedot

Narttuja (56 %) oli mukana tutkimuksessa hieman uroksia (44 %) enemmän, mutta ero eri sukupuolia edustavien yksilöiden määrien välillä oli melko pieni, eikä tämän perusteella voida päätellä, että lymfosytoosin esiintyminen keuhkohuuhtelunäytteessä liittyisi koiran sukupuoleen.

Koko aineistossa iän keskiarvo oli 5,79 vuotta (kts. taulukko 2). Ryhmien välillä oli hajontaa: vanhimmat koirat löytyivät pääasiassa ryhmästä 5 (aikaisempi EBP), jossa iän keskiarvo oli 8,65 vuotta, ja ryhmästä 1 (krooninen bronkiitti), jossa iän keskiarvo oli 8,36 vuotta. Nuorimmat koirat löytyivät pääasiassa ryhmästä 2 (hengitystieoireet ilman tähystyslöydöksiä), jossa iän keskiarvo oli 4,20 vuotta. Keuhkohuuhtelunäytteen lymfosytoosilla ei tämän perusteella näytä olevan yhteyttä koiran ikään, vaan todetut ikävaihtelut eri ryhmien välillä liittyivät kyseiselle sairaudelle tyypilliseen ilmenemiskään. Myöskään tilastollisesti merkitseviä korrelaatioita iän ja keuhkohuuhtelunäytteen lymfosytoosin välillä ei havaittu. Iän ja joidenkin hengitystiesairauksien välillä sen sijaan on havaittu yhteyksiä: esim. kroonista bronkiittia esiintyy useimmiten keski-ikäisillä ja vanhoilla koirilla (Johnson 2010), mikä pätee myös tämän tutkimuksen aineistossa. Ryhmän 2 koirat olivat enimmäkseen kohtalaisen nuoria, ja niillä ei havaittu tähystyslöydöksiä. Voisiko kyseisen ryhmän koirilla olla kroonisen inflammatorisen hengitystiesairauden alkuvaihe, jossa tähystyksessä silminnähettävät muutokset eivät ole vielä kehittyneet?

Yleisimmät rodut tutkimusaineistossa olivat irlanninsusikoirat ja englanninbulldoggi. Kaikki aineiston irlanninsusikoirat kuuluivat ryhmään 4, jonka koirilla oli diagnosoitu aiemmin pneumonia tai *Bordetella bronchiseptica* -infektio. Pneumonioiden ovat suhteellisen yleisiä sairauksia irlanninsusikoirilla (Johnson 2010, Greenwell & Brain 2014). Rodun ja sairauden välinen yhteys onkin todennäköisempi syy sille, että irlanninsusikoirat olivat tutkimuksen yleisin rotu, kuin

rodun ja keuhkokuuhtelunäytteen lymfocytoosin välinen yhteys.

Englanninbulldoggeista taas kuusi seitsemästä koirasta (86 %) kuului ryhmään 3, jossa ongelma paikallistui ylähengitysteihin. Kyseisillä kuudella koiralla ei ollut rodulla runsaasti esiintyvän brakykefaalisen oireyhtymän (Fasanella ym. 2010) lisäksi muita oireita, ja tässäkin tapauksessa rodun ja sairauden välinen yhteys vaikuttaisi syyltä englanninbulldoggien lukumäärään aineistossa. Eri rotuja oli aineistossa mukana yhteensä 32, eli lymfocytoosia voi esiintyä hyvin monen eri rotuisen koiran keuhkokuuhtelunäytteessä.

Painon keskiarvo koko aineistossa oli 29,3 kg. Taulukon 2 perusteella voidaan havaita, että painon suhteen esiintyy hajontaa ryhmien välillä. Esim. ryhmässä 1 on pääasiassa melko pieniä koiria, ja ryhmässä 4 taas on keskimäärin melko suuria koiria. Ryhmän 1 koirilla oli todettu krooninen bronkiitti, mikä on tyypillisesti enemmän pienten kuin suurten koirien sairaus (Rozanski 2014). Ryhmän 4 koirilla taas esiintyi pneumoniamia ja *Bordetella bronchiseptica* -infektioita. Kyseisen ryhmän koirista moni oli rodultaan irlanninsusikoiria. Ne ovat suurikokoisia koiria, ja kuten edellisessä kappaleessa mainittiin, pneumoniat ovat niillä suhteellisen yleisiä (Johnson 2010, Greenwell & Brain 2014). Yhteyksiä koiran koon ja tiettyjen hengitystiesairauksien välillä siis on, mutta tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota eläimen painon ja keuhkokuuhtelunäytteen lymfocytoosin välillä ei tämän tutkimuksen perusteella havaittu (kts. liite 1).

### **4.3 Oireet ja niiden kesto**

Kaikissa viidessä ryhmässä yleisin oire oli yskä eri muodoissaan. Myös erilaisia muutoksia hengityksessä esiintyi kohtalaisen runsaasti. Muita tyypillisiä oireita olivat apatia, heikentynyt rasituksensietokyky ja ruokahalun väheneminen, joiden voisi ainakin osittain ajatella olevan seurausta yskästä tai hengityksen muutoksista. Yleisimmät oireet olivat hengitystiesairauksille hyvin tyypillisiä (Johnson 2010), eikä yhtä tiettyä tarkasti määriteltyä oiretta voida tämän perusteella yhdistää keuhkokuuhtelunäytteen lymfocytoosiin, vaan pikemminkin lymfocytoosia voisi ajatella esiintyvän osalla hengitystieoireilevista koirista.

Oireiden keston mediaani oli kaikissa ryhmissä useita kuukausia, ja koko aineiston osalta kuusi kuukautta (kts. taulukko 2). Tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota oireiden keston ja keuhkokuuhtelunäytteen lymfosyytoosin välillä ei havaittu (kts. liite 1). Usein keuhkokuuhtelunäyte otetaan potilaalta vasta, kun muita tutkimuksia on jo tehty, ja mahdollinen antibioottihoito tai -hoidot eivät ole tehonneet toivotusti (Hawkins ym. 1995). Tässäkin tutkimusaineistossa moni potilaista oli lähetepotilaita, joita oli jo tutkittu tai hoidettu melko paljon. Olisikin kiinnostavaa tietää, mikä lymfosyyttien suhteellinen osuus aineiston koirien keuhkokuuhtelunäytteissä olisi ollut aivan oireilun alussa.

#### **4.4. Veri- ja ulostenäytteiden sekä rintaontelon röntgenkuvien löydökset**

Hematologian osalta tulokset olivat valtaosalla koirista viiterajoissa, eikä ryhmien välinen vaihtelu tuloksissa ollut kovin suurta (kts. taulukko 3).

Keuhkokuuhtelunäytteen lymfosyyttien suhteelliseen osuuteen tuloksilla ei havaittu olevan tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota, kuten liitteestä 1 nähdään.

Verikaasujen tutkiminen verinäytteestä auttaa arvioimaan, kärsiikö eläin hypoksemiasta ja kuinka voimakas hypoksemia on. Joissain tilanteissa verikaasunäytteen tulokset auttavat myös rajaamaan hypoksemian mahdollisia taustasyitä, vaikka lähes kaikissa keuhkosairauksissa taustalla on ventilaation ja perfuusion epäsuhta (Johnson 2010). Koko aineiston keskiarvo hiilidioksidin osapaineen ( $p\text{CO}_2$ ) osalta oli 30,0 mmHg ja hapen osapaineen ( $p\text{O}_2$ ) osalta 90,1 mmHg. Alveolaarisen hapen ja valtimoveren hapen pitoisuuksien erotuksen ( $A-a\text{O}_2$ ) osalta koko ryhmän mediaani oli 22,3. Johnsonin (2010) mukaan normaaliarvot koirille ovat hiilidioksidin osapaineen osalta 37 (32–43) mmHg, hapen osapaineen osalta 90 (80–105) mmHg, ja  $A-a\text{O}_2$ :n osalta alle 15. Verikaasujen viitearvoissa esiintyy kuitenkin analysaattorikohtaisia eroja (Roels ym. 2016). Näytteenottotekniikka ja näytteen käsittely voivat vaikuttaa tuloksiin jossain määrin (Johnson 2010). Tuloksissa on kohtalaisen paljon hajontaa ryhmien sisällä (kts. taulukko 4), erityisesti  $p\text{O}_2$ :n ja  $A-a\text{O}_2$ :n osalta. Tuloksilla ei havaittu

olevan keuhkohuuhtelunäytteen lymfosyyttien suhteelliseen osuuteen tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota (kts. liite 1).

Ulostenäytetutkimuksissa flotaatio- ja Baermann –menetelmillä tutkitut näytteet olivat negatiivisia kaikilla aineiston koirilla, joilta kyseiset näytteet oli otettu. Kahdelta aineiston koiralta oli löydetty *Giardia*-alkueläin. Ihmisillä *Giardia*-tartunta voi liittyä eosinofiilisiin rintaontelon sairauksiin (Varela & Siso 1979). Ryhmän 5 koirilta, joilla oli todettu aiemmin eosinofiilinen bronkopneumopatia, ei kuitenkaan löydetty *Giardiaa* ulostenäytteistä. Näyte oli tutkittu kahdelta neljästä ryhmän koirasta. Viitteitä keuhkohuuhtelunäytteen lymfosytoosin ja ulostenäytteiden positiivisten löydösten yhteydestä ei tämän tutkimuksen perusteella havaittu. On kuitenkin huomioitava, että *Giardia* esiintyvyyttä oli tutkittu vain 33 % koirista, ja löydöksiä olisi saattanut olla enemmän, jos tutkimus olisi tehty koko aineiston koirille. *Giardia*sin yhteys eosinofiilisiin hengitystiesairauksiin voisi kuitenkin olla todennäköisempi kuin yhteys keuhkohuuhtelunäytteen lymfosytoosiin.

Koko aineistossa yleisin keuhkojen röntgenlöydös oli bronkiaalinen keuhkokuvioitus (n = 16). Myös bronkointerstiaalista keuhkokuvioitusta havaittiin monella koiralla (n = 11). Lievä bronkiaalinen tai bronkointerstiaalinen keuhkokuvioitus röntgenkuvissa on koirilla usein normaali iän tuoma muutos, ja yksittäisenä muutoksena melko epäspesifinen (Kealy ym. 2011). Alveolaarista tiiviyyttä esiintyi lähinnä ryhmän 4 koirilla, joista monella oli pneumoniataustaa. Alveolaarisen tiiviyyden tiedetään olevan pneumonialle tyypillistä (Johnson 2010). Muilta osin röntgenlöydöksissä oli havaittavissa samankaltaisuutta eri ryhmien ja siten erityyppisten sairauksien välillä. Jonkin tietyn yksittäisen röntgenlöydöksen ja keuhkohuuhtelunäytteen lymfosytoosin välillä ei havaittu selvää yhteyttä tämän tutkimuksen perusteella. Usein röntgentutkimus auttaakin rajaamaan differentiaali diagnoosien listaa, mutta lopulliseen diagnoosiin pääseminen edellyttää muita tutkimuksia sen lisäksi (Johnson 2010).

## 4.5 Korrelaatiot

Keuhkohuuhtelunäytteen lymfosytoosin suhteen ryhmien väliset erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä (kts. kuva 1). Keuhkohuuhtelunäytteen lymfosyyttien suhteellinen osuus sen sijaan korreloi aineistossa tilastollisesti merkitsevästi keuhkohuuhtelunäytteen makrofagien suhteellisen osuuden kanssa. Negatiivinen korrelaatio oli tässä oletettava: kun mietitään suhteellisia osuuksia näytteessä, on yhden arvon kasvaessa toisen pienennyttävä. Alveolaariset makrofagit ovat keuhkohuuhtelunäytteessä yleensä vallitsevia soluja (Rha & Mahony 1999, Rajamäki ym. 2001, Andreasen 2003, Hawkins 2004), ja on oletettavaa, että juuri niiden osuuden pieneneminen näkyy selvästi, jos jonkun muun solutyypin osuus kasvaa. Liitteen 1 taulukosta nähdään, että keuhkohuuhtelunäytteen makrofageilla oli tilastollisesti merkitsevää negatiivista korrelaatiota myös keuhkohuuhtelunäytteen neutrofiilien ja eosinofiilien kanssa.

Vaikka keuhkohuuhtelunäytteen lymfosyyttien osalta tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota ei havaittukaan kuin keuhkohuuhtelunäytteen makrofagien kanssa, liitteen 1 taulukosta voidaan nähdä useiden muiden parametrien välisiä tilastollisesti merkitseviä korrelaatioita. Kuten keuhkohuuhtelunäytteessä, myös hematologisissa näytteissä eri solujen suhteellisten osuuksien vertailuissa huomataan useita tilastollisesti merkitseviä korrelaatioita. Näiden lisäksi tilastollisesti merkitseviä korrelaatioita löytyy sellaistenkin tekijöiden väliltä, joiden korrelaatioita on vaikeampi selittää. Esim. eläimen iällä ja painolla havaittiin olevan useita tilastollisesti merkittäviä korrelaatioita verinäytetulosten kanssa, mitä olisi mielenkiintoista tutkia tarkemmin.

## 4.6 Tutkimuksen haasteet

Merkinnät potilaskorteilla aiheuttivat jonkin verran haasteita tutkimukseen erityisesti oireilun kuvailun suhteen. Osalla aineiston koirista merkinnät olivat hyvin yksityiskohtaisia, osalla taas melko suurpiirteisiä. Potilaiden esitietoja on ollut kirjaamassa potilasohjelmaan useita eri eläinlääkäreitä, hoitajia sekä eläinlääketieteen opiskelijoita, ja esitietojen kirjaamisen tyyliä ja tarkkuudessa

oli havaittavissa melko runsaasti vaihtelua. Myös omistajien kertomassa oli vaihtelua, eivätkä he aina olleet täysin selvillä koiransa oireilun kestosta tai tyypistä. Tämä hankaloitti hieman oireiden kuvailun käsittelyä. Numeeriset arvot, kuten verinäytetulokset, olivat luonnollisesti paljon yhtenäisempiä, ja siten niitä oli helpompi vertailla keskenään.

Keuhkohuuhtelunäytteen tulosten vertailemisen mahdollistamiseksi näyte olisi hyvä ottaa aina mahdollisimman samalla tavalla (Hawkins 2004).

Tutkimusaineiston koirilla oli useita erityyppisiä hengitystiesairauksia, erilaisia muita oireita tai sairauksia ja erilaisia lääkityksiä. Näytteitä on ollut ottamassa useita eri eläinlääkäreitä, joista toisilla on ollut enemmän kokemusta toimenpiteestä kuin toisilla. Myös huuhdeltavassa keuhkojen alueessa, huuhtelukertojen määrässä, huuhteluun kuluneessa ajassa ja käytetyssä paineessa sekä näytteen säilytyksessä ja käsittelyssä on voinut olla pieniä eroavaisuuksia, vaikka keuhkohuuhtelu Yliopistollisella eläinsairaalalla suoritetaankin pääpiirteittäin aina samalla tavalla eläimen painonmukaista huuhtelunesteen määrää käyttäen (Melamies ym. 2011). Baughmanin & Rennardin (1999) mukaan edellä mainituilla tekijöillä voi olla vaikutusta näytteen tuloksiin.

#### **4.7 Tulokset ja tulevaisuus**

Tutkimuksen vahvuutena voidaan pitää aineiston kokoa sekä sitä, että tutkimuksessa selvitettiin keuhkohuuhtelunäytteen lymfosytoosin yhteyttä moneen eri tekijään. Keuhkohuuhtelunäytteen lymfosytoosin taustan syvempi ymmärtäminen vaatisi kuitenkin jatkotutkimuksia. Lymfosyyttejä on useita erityyppisiä (Delves ym. 2006), eikä tässä tutkimuksessa selvitetty, mitkä lymfosyyttien alatyypit ovat mahdollisesti vallalla kunkin hengitystiesairauden yhteydessä. Tutkimusta aiheesta voisikin jatkaa esim. seuraavalla tavalla: keuhkohuuhtelunäytteen, jossa havaitaan lymfosyytoosi, soluja voisi värjätä pintamarkkeriväreillä. Virtaussytometrian avulla voisi selvittää, ovatko lymfosyytit T- vai B-lymfosyyttejä, ja ovatko niiden CD- pintamolekyylit erilaisia eri keuhkosairauksien yhteydessä.

Ihmisillä hypersensitiivinen pneumoniitti (allerginen alveoliitti) on tyypillinen diagnoosi potilailla, joiden keuhkohuuhtelunäytteissä havaitaan lymfocytoosia. Sairauden diagnostiikka on kuitenkin haastavaa ja monivaiheista, ja perustuu suurelta osin muiden sairauksien poissulkemiseen. Diagnoosiin pääsemiseksi tärkeässä roolissa ovat esitiedot ja oirekuva, kliininen yleistutkimus, seerumin spesifiset IgG-vasta-aineet, röntgenlöydökset sekä keuhkohuuhtelunäytteen löydökset. Monesti vasta keuhkobiopsian histopatologinen tutkimus auttaa varmistamaan diagnoosin (Vasakova ym. 2017). Koirilla raportoidut tapaukset ovat yksittäisiä ja sairaus huonosti tunnettu (Whitney ym. 2013). Olisi kiinnostavaa tietää, voisiko lymfocytoosin taustalla olla hypersensitiivinen pneumoniitti tai sen kaltainen sairaus sellaisilla koirilla, joilla on havaittu lymfocytoosi keuhkohuuhtelunäytteessä ilman selittäviä tähystys- tai muita löydöksiä. Tutkimusta aiheesta voisikin jatkaa mm. ottamalla keuhkobiopsioita koirilta, joilla havaitaan lymfocytoosi keuhkohuuhtelunäytteessä ilman tähystys- tai muita löydöksiä. Keuhkobiopsia on tosin invasiivinen ja moniin muihin hengitysteiden tutkimuksiin verrattuna kallis menetelmä (Griffin 2004), mikä saattaisi rajoittaa tutkimuksen aineistoa.

Selkeää yksittäistä yhdistävää tekijää aineiston koirien välillä ei havaittu keuhkohuuhtelunäytteen lymfocytoosin ja hengitystiesairauden lisäksi. Onkin oletettavaa, että lymfocytoosin etiologia keuhkohuuhtelunäytteessä on monitekijäinen, ja lymfocytoosin aiheutumisen mekanismit ovat tällöin eri sairauksissa erilaiset.



## 5 LÄHTEET

Andreasen CB. Bronchoalveolar Lavage. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2003, 33: 69–88.

Baughman RP & Rennard SI. Bronchoalveolar Lavage: General Approaches to Correct for Variability of Dilution and Lung Permeability. *European Respiratory Review* 1999, 9: 28–31.

Creevy KE. Airway Evaluation and Flexible Endoscopic Procedures in Dogs and Cats: Laryngoscopy, Transtracheal Wash, Tracheobronchoscopy, and Bronchoalveolar Lavage. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2009, 39: 869–880.

Dehard S, Bernaerts F, Peeters D, Detilleux J, McEntee K, Day MJ, Clercx C. Comparison of Bronchoalveolar Lavage Cytospins and Smears in Dogs and Cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2008, 44: 285–294.

De Lorenzi D, Masserdotti C, Bertoncetto D, Tranquillo V. Differential Cell Counts in Canine Cytocentrifuged Bronchoalveolar Lavage Fluid: A Study on Reliable Enumeration of Each Cell Type. *Veterinary Clinical Pathology* 2009, 38: 532–536.

Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. *Roitt's Essential Immunology*. 11. p. Blackwell Publishing, USA 2006.

Fasanella FJ, Shivley JM, Wardlaw JL, Givaruangsawat S. Brachycephalic Airway Obstructive Syndrome in Dogs: 90 cases (1991–2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2010, 237: 1048–1051.

Greenwell CM & Brain PH. Aspiration Pneumonia in the Irish Wolfhound: A Possible Breed Predisposition. *The Journal of Small Animal Practice* 2014, 55: 515–520.

Griffin GM. Lung Biopsy and Thoracoscopy. Teoksessa: King LG (toim.) Textbook of Respiratory Disease in Dogs and Cats. 1. p. Elsevier, Missouri 2004: 153–156.

Hawkins EC. Bronchoalveolar Lavage. Teoksessa: King LG (toim.) Textbook of Respiratory Disease in Dogs and Cats. 1. p. Elsevier, Missouri 2004: 118–128.

Hawkins EC, DeNicola DB, Kuehn NF. Bronchoalveolar Lavage in the Evaluation of Pulmonary Disease in the Dog and Cat. State of Art. Journal of Veterinary Internal Medicine 1990, 4: 267–274.

Hawkins EC, DeNicola DB, Plier ML. Cytological Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid in the Diagnosis of Spontaneous Respiratory Tract Disease in Dogs: A Retrospective Study. Journal of Veterinary Internal Medicine 1995, 9: 386–392.

Hawkins EC, Morrison WB, DeNicola DB, Blevins WE. Cytologic Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluid from 47 Dogs with Multicentric Malignant Lymphoma. Journal of the American Veterinary Medical Association 1993, 15: 1418–1425.

Heikkilä HP, Lappalainen AK, Day MJ, Clercx C, Rajamäki MM. Clinical, Bronchoscopic, Histopathologic, Diagnostic Imaging, and Arterial Oxygenation Findings in West Highland White Terriers with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Journal of Veterinary Internal Medicine 2011, 25: 433–439.

Heikkilä-Laurila HP & Rajamäki MM. Idiopathic Pulmonary Fibrosis in West Highland White Terriers. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice 2014, 44: 129–142.

Hirt RA, Wiederstein I, Denner EB, Mosing M, de Arespachoga AG, Spargser J, van den Hoven R. Influence of the Collection and Oxygenation Method on Quantitative Bacterial Composition in Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from Healthy Dogs. The Veterinary Journal 2010, 184: 77–82.

Hänninen A. Lymfosyyttien aktivaatio. Teoksessa: Hedman K, Heikkinen T, Huovinen P, Järvinen A, Meri S, Vaara M (toim.) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet: Kirja 2, Immunologia. 1. p. Duodecim, Helsinki 2011: 88–100 .

Johnson LR. Clinical Canine and Feline Respiratory Medicine. 1. p. Blackwell Publishing, Iowa 2010.

Kealy JK, McAllister H, Graham JP. Diagnostic Radiology and Ultrasonography of the Dog and Cat. 5. p. Elsevier, Missouri 2011.

Kebbe J & Abdo T. Interstitial Lung Disease: the Diagnostic Role of Bronchoscopy. Journal of Thoracic Disease 2017, 9: 996–1010.

Melamies MA, Järvinen AK, Seppälä KM, Rita HJ, Rajamäki MM. Comparison of Results for Weight-adjusted and Fixed-amount Bronchoalveolar Lavage Techniques in Healthy Beagles. American Journal of Veterinary Research 2011, 72: 694–698.

Mercier E, Bolognin M, Hoffmann AC, Tual C, Day MJ, Clercx C. Influence of Age on Bronchoscopic Findings in Healthy Beagle Dogs. The Veterinary Journal 2011, 187: 225–228.

Peeters DE, McKiernan BC, Weisiger RM, Schaeffer DJ, Clercx C. Quantitative Bacterial Cultures and Cytological Examination of Bronchoalveolar Lavage Specimens in Dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine 2000, 14: 534–541.

Rajamäki MM, Järvinen AK, Saari SAM, Maisi PS. Effect of Repetitive Bronchoalveolar Lavage on Cytologic Findings in Healthy Dogs. American Journal of Veterinary Research 2001, 62: 13–16.

Reijula KE, Bota B, Kurup VP, Clifford PS, Choi H, Coon RL, Fink JN. Pigeon-serum-induced Hypersensitivity Pneumonitis in the Dog. Allergy 1995, 50: 78–84.

Rennard SI, Basset G, Lecossier D, O'Donnel KM, Pinkston P, Martin PG, Crystal RG. Estimation of Volume of Epithelial Lining Fluid Recovered by using Urea as Marker of Dilution. *Journal of Applied Physiology* 1986, 60: 532–538.

Rha JY & Mahony O. Bronchoscopy in Small Animal Medicine: Indications, Instrumentation and Techniques. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 1999, 14: 207–212.

Riario Sforza GG & Marinou A. Hypersensitivity Pneumonitis: A Complex Lung Disease. *Clinical and Molecular Allergy* 2017, 15:6.

Roels E, Gommeren K, Farnir F, Delvaux F, Billen F, Clercx C. Comparison of 4 Point-of-care Blood Gas Analyzers for Arterial Blood Gas Analysis in Healthy Dogs and Dogs with Cardiopulmonary Disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2016, 26: 352–359.

Rozanski E. Canine Chronic Bronchitis. *The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 2014, 44: 107–116.

Salmi M & Meri S. Immuunijärjestelmän solut ja niiden kehitys. Teoksessa: Hedman K, Heikkinen T, Huovinen P, Järvinen A, Meri S, Vaara M (toim.) *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet: Kirja 2, Immunologia*. 1. p. Duodecim, Helsinki 2011: 18–29.

Sjaastad ØV, Sand O, Hove K. Immunology. Teoksessa: *Physiology of Domestic Animals*. 2. p. Scandinavian Veterinary Press, Oslo 2010: 334–354 .

Souweine B, Veber B, Bedos JP, Gachot B, Dombret MC, Regnier B, Wolff M. Diagnostic Accuracy of Protected Specimen Brush and Bronchoalveolar Lavage in Nosocomial Pneumonia: Impact of Previous Antimicrobial Treatments. *Critical Care Medicine* 1998, 26: 236–244.

Syring RS. Tracheal Washes. Teoksessa: King LG (toim.) Textbook of Respiratory Disease in Dogs and Cats. 1. p. Elsevier, Missouri 2004: 128–134.

Taskinen E. Keuhkopatologiaa. Teoksessa: Kinnula V, Tukiainen P, Laitinen LA (toim.) Keuhkosairaudet. 1. p. Duodecim, Jyväskylä 1997: 86–119.

Tizard IR. Veterinary Immunology. 9. p. Elsevier, Missouri 2013.

Tukiainen P. Bronkoskopia. Teoksessa: Kinnula V, Tukiainen P, Laitinen LA (toim.) Keuhkosairaudet. 1. p. Duodecim, Jyväskylä 1997: 232–244.

Varela J & Siso C. Eosinophilic Pleural Effusion during the Course of a Giardiasis. Report of a Case (Author's Transl.). Medicina Clinica (Barc.) 1979, 72: 57–60.

Vasakova M, Morell F, Walsh S, Leslie K, Raghu G. Hypersensitivity Pneumonitis: Perspectives in Diagnosis and Management. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2017, 196: 680–689.

Whitney J, Beijerink N, Martin P, Talbot J, Barrs V. Hypersensitivity Pneumonitis in a Dog associated with *Geastrum triplex* Spores. Medical Mycology Case Reports 2013, 2: 122–124.

Williams JL & Finnegan K. Lymphocytes. Teoksessa: McKenzie SB & Williams JL (toim.) Clinical Laboratory Hematology. 3. p. Pearson Education Inc, New Jersey 2015: 123–139.

Woods KS, Defarges AM, Abrams-Ogg AC, Dobson H, Brisson BA, Viel L, Bienzle D. Comparison of Bronchoalveolar Lavage Fluid obtained by Manual Aspiration with a Handheld Syringe with that obtained by Automated Suction Pump Aspiration from Healthy Dogs. American Journal of Veterinary Research 2014, 75: 85–90.

## LIITE 1

Taulukoitujen parametrien väliset merkittävät korrelaatiot ( $p < 0,05$ ) pyöristettynä kahden desimaalin tarkkuudella. Normaalijakauman mukaisesti jakautuneille parametreille on käytetty Pearsonin korrelaatiokerrointa (keltainen yliväivaus) ja ei-parametrisille arvoille Spearmanin järjestyskorrelaatiokerrointa (vihreä yliväivaus). Neutrofiilien yhteydessä lt viittaa liuskatumaisiin ja st sauvatumaisiin neutrofiileihin.

		Perustiedot			Hematologia		
		Ikä	Paino	Oireiden kesto	Leukosyytit	Neutrofiilit,lt	Neutrofiilit,st
Perustiedot	Ikä						
	Paino						
	Oireiden kesto				0,01 (r = -0,33)		
Hematologia	Leukosyytit			0,01 (r = -0,33)		0,00 (r = 0,89)	
	Neutrofiilit,lt				0,00 (r = 0,89)		
	Neutrofiilit,st						
	Lymfosyytit	0,00 (r = -0,66)	0,01 (r = -0,32)	0,02 (r = -0,32)	0,00 (r = 0,55)	0,00 (r = 0,39)	0,01 (r = -0,34)
	Monosyytit				0,00 (r = 0,49)	0,00 (r = 0,45)	
	Eosinofiilit		0,00 (r = -0,44)	0,02 (r = -0,31)	0,01 (r = 0,32)		0,03 (r = -0,27)
	Basofiilit						
Verikaasut	pCO2	0,01 (r = -0,34)					
	pO2						
	A-apO2		0,02 (r = -0,32)		0,02 (r = 0,33)		
BALF	Solut tot.	0,02 (r = -0,29)					
	Makrofagit		0,02 (r = 0,32)		0,02 (r = -0,29)		
	Lymfosyytit						
	Neutrofiilit				0,00 (r = 0,39)	0,02 (r = 0,30)	
	Eosinofiilit			0,04 (r = -0,28)			
	Mastsolut	0,00 (r = 0,36)					
	Epiteelisolut						

		Hematologia				Verikaasut		
		Lymfosyytit	Monosyytit	Eosinofiilit	Basofiilit	pCO2	pO2	A-apO2
Perustiedot	Ikä	0,00 (r = -0,67)				0,01 (r = -0,34)		
	Paino	0,01 (r = -0,33)		0,00 (r = -0,44)				0,02 (r = -0,32)
	Oireiden kesto			0,02 (r = -0,31)				
Hematologia	Leukosyytit	0,00 (r = 0,39)	0,00 (r = 0,49)	0,01 (r = 0,32)				0,02 (r = 0,33)
	Neutrofiilit		0,00 (r = 0,45)					
	Neutrofiilit	0,02 (r = -0,31)						
	Lymfosyytit		0,01 (r = 0,35)					
	Monosyytit	0,04 (r = 0,26)				0,03 (r = 0,29)		
	Eosinofiilit	0,03 (r = 0,27)						
	Basofiilit							
Verikaasut	pCO2	0,03 (r = 0,30)	0,00 (r = 0,39)				0,01 (r = -0,35)	
	pO2		0,02 (r = -0,31)			0,01 (r = -0,35)		0,00 (r = -0,75)
	A-apO2						0,00 (r = -0,78)	
BALF	Solut tot.							
	Makrofagit			0,01 (r = -0,35)				0,01 (r = -0,34)
	Lymfosyytit							
	Neutrofiilit		0,02 (r = 0,29)					
	Eosinofiilit			0,00 (r = 0,42)				
	Mastsolut							
	Epiteelisolut							

		BALF						
		Solut tot.	Makrofagit	Lymfosyytit	Neutrofiilit	Eosinofiilit	Mastsolut	Epiteelisolut
Perustiedot								
	Ikä						0,00 (r = 0,36)	
	Paino		0,02 (r = 0,32)					
	Oireiden kesto					0,04 (r = -0,28)		
Hematologia								
	Leukosyytit		0,02 (r = -0,29)		0,00 (r = 0,39)			
	Neutrofiilit				0,02 (r = 0,30)			
	Neutrofiilit							
	st							
	Lymfosyytit				0,05 (r = 0,25)			
	Monosyytit				0,02 (r = 0,29)			
	Eosinofiilit		0,01 (r = -0,35)			0,00 (r = 0,42)		
	Basofiilit							
Verikaasut	pCO2							
	pO2							
	A-apO2		0,01 (r = -0,34)					
BALF								
	Solut tot.						0,00 (r = -0,42)	0,01 (r = -0,33)
	Makrofagit			0,00 (r = -0,48)	0,00 (r = -0,39)	0,01 (r = -0,35)		
	Lymfosyytit		0,00 (r = -0,48)					
	Neutrofiilit		0,00 (r = -0,39)					
	Eosinofiilit		0,01 (r = -0,35)				0,02 (r = 0,30)	
	Mastsolut	0,00 (r = -0,42)				0,02 (r = 0,30)		
	Epiteelisolut	0,01 (r = -0,33)						